

\_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

M.	F. CALDERON-CERVANTES, Professeur UNIDA-ITV Mexique	Rapporteur
M.	A. HEYRAUD, Directeur de Recherche CNRS Cermav Grenoble	Rapporteur
Mme.	H. ROUX DE BALMAN, Directeur de Recherche CNRS LGC Toulouse	Rapporteur
Mme.	E. DUMAY, Professeur UM2	Examineur
M.	G. POURCELLY, Professeur UM2	Examineur
Mme.	M. P. BELLEVILLE, Maître de conférence UM2	Directeur de thèse
M.	T. DOCO, Chargé de Recherche INRA Montpellier	Invité
M.	M. DORNIER, Maître de conférence Montpellier SupAgro	Invité

## ***REMERCIEMENTS***

Ce travail a été réalisé à l'Institut Européen des Membranes (IEM) dans le cadre d'un Programme de la Commission européenne Alþan destiné à l'Amérique latine. J'ai été très honorée de l'attribution d'une bourse d'étude Alþan « E04D032803MX » et d'avoir eu le privilège de faire cette thèse à l'Université Montpellier II.

Je tiens à exprimer ma gratitude à Mr. le Professeur Gérard POURCELLY Directeur de l'IEM pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, j'exprime aussi ma reconnaissance à Mme Véronique CHEYNIER directeur de recherche INRA, responsable de l'équipe « Polyphénols Interactions » (INRA-Montpellier), qui m'a autorisée à utiliser ses équipements analytiques et à M. Max REYNES responsable de l'UMR Qualisud (CIRAD-Persyst).

Mes remerciements vont aussi à la Coordination Générale des Universités Technologiques (CGUT), du conseil directif de l'Université Technologique de Tecamachalco au Mexique (UTT) ainsi qu'à M. José LOPEZ MEDINA, ex-recteur et M. Othón C. RIOS VAZQUEZ actuel recteur de l'UTT pour leur soutien et leur aide qui m'ont permis de réaliser cette formation.

Je remercie Mme. H. ROUX DE BALMAN, Directeur de Recherche CNRS LGC Toulouse, M. A. HEYRAUD, Directeur de Recherche CNRS Cermav Grenoble et M. F. CALDERON-CERVANTES, Professeur UNIDA-ITV Mexique d'avoir accepté de juger ce travail et de participer au jury de soutenance en tant que rapporteurs ainsi que Mme. E. DUMAY, Professeur UM2 qui m'a fait l'honneur d'assurer la présidence de ce jury.

Ma reconnaissance est particulièrement adressée à mes encadrants de thèse ; Mme. Marie Pierre BELLEVILLE Maître de conférences et M. le Professeur Gérard POURCELLY de l'IEM, M. Thierry DOCO Chargé de Recherche et Mme. Pascale WILLIAMS Assistant Ingénieur de l'INRA ainsi que M. Manuel DORNIER Professeur à Montpellier-SupAgro. En effet, grâce vos précieux conseils et soutiens scientifiques quotidiens, j'ai pu mener à bien ce sujet malgré tous les obstacles rencontrés à son début. Je vous dois grandement d'avoir obtenu mon titre avec la mention « très honorable ».

Je remercie aussi l'entreprise AGAVIOTICA S.A. DE C.V., la Fondation Produce Puebla (FUPPUE), le Dr. Carlos ARIAS de l'Institut Technologique de Tlajomulco de Zuñiga Jalisco, le Dr. Mercedes LOPEZ de CINVESTAV Irapuato, Lic. Marina BETANCOURT ainsi que M.C. Araceli LOPEZ, l'Ing. Blanca Rosa VALTIERRA, et l'Ing. Cecilio OJEDA et les producteurs d'agave de la région de Lomas de Romero, Tecamachalco Puebla, mais aussi de la région de Tequila Jalisco sans oublier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la préparation et l'envoi des différents échantillons nécessaires au cours de cette thèse.

Je présente également mes remerciements à M. Julien TROQUET et M. Jean-Christophe LASSERRE de TechnoMembranes Développement, Montpellier de m'avoir ponctuellement accueillie dans leur laboratoire.

Je souhaite aussi adresser mes remerciements mention « très spéciale » à Marie Pierre BELLEVILLE, Pascale WILLIAMS, Thierry DOCO, Patricia ESCOBAR, Valérie BONNIOL et Loubna ATFANE pour avoir partagé avec moi les moments les plus difficiles et qui, en m'ayant fait confiance, ont fait que j'ai eu confiance pendant toutes ces années. Tous ces souvenirs communs resteront indélébiles. Mais la plus grande chose est qu'ils m'ont aussi accordé leur amitié et auront toujours une place dans mon cœur.

J'exprime toute ma sympathie et mes remerciements à l'ensemble du personnel des différents instituts ayant contribué de près ou de loin à mon travail. Principalement à l'équipe Génie des Procédés Membranaires, à l'équipe Polyphénols Interactions, et à QUALISUD pour leur convivialité et l'appui moral. Merci à tous...

Enfin, je dédie cette thèse à *Miguel Angel* mon mari, lui qui m'a encouragée et a sacrifié ses projets professionnels pour me suivre sur un autre continent. Je dédie aussi ce travail à mes petits anges, *Angélica et Nayeli* qui, jour après jour, m'ont offert leur énergie, leur confiance et leur amour. Mon cœur et ma vie sont à vous tous, merci d'avoir accepté de partager avec moi cette expérience et d'avoir contribué au quotidien à mon équilibre personnel!

A ceux qui sont toujours présents dans mon cœur, mes parents *Rosa et David*, mes frères *Chucho* et *Victor*, ma grand mère *Pinita* et toute ma famille et mes amis qui, malgré la distance, ont toujours trouvé le moyen de m'exprimer leur confiance et leur soutien par des paroles réconfortantes.

# SOMMAIRE

<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>4</b>
<b>VALORISATION DES TRAVAUX DE RECHERCHE .....</b>	<b>8</b>
<b>INSTITUTIONS IMPLIQUÉES ET PARTENAIRES .....</b>	<b>9</b>
 <b>CHAPITRE 1 SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	 <b>10</b>
<b>I. GÉNÉRALITES SUR LES AGAVES ET LES JUS D'AGAVES.....</b>	<b>10</b>
A. TAXONOMIE DE L'AGAVE .....	10
B. RÉPARTITION GÉOGRAPHIQUE DES AGAVES.....	11
C. DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE ET REPRODUCTION DES AGAVES .....	11
D. RÉSERVES ÉNERGÉTIQUES DES AGAVES.....	14
E. PRINCIPALES UTILISATIONS DES AGAVES PULQUÉRO ET TEQUILANA.....	15
F. AVENIR DE LA CULTURE ET DES PRODUITS DÉRIVÉS D'AGAVES AU MEXIQUE .....	22
<b>II. LES FRUCTANES.....</b>	<b>26</b>
A. GÉNÉRALITÉS .....	26
B. DÉFINITION ET STRUCTURE .....	28
C. EFFETS PHYSIOLOGIQUES DES FRUCTANES COMME PRÉBIOTIQUES .....	33
D. PRINCIPALES APPLICATIONS DES FRUCTANES EN INDUTRIE ALIMENTAIRE.....	35
E. PRINCIPALES ENTREPRISES COMMERCIALISANT DES FRUCTANES .....	37
F. PRODUCTION INDUSTRIELLE DE FRUCTANES .....	39
<b>III. GÉNÉRALITES SUR LES TECHNIQUES MEMBRANAIRES.....</b>	<b>43</b>
A. DÉFINITION ET CLASSIFICATION DES TECHNIQUES MEMBRANAIRES .....	43
B. MEMBRANES ET MODULES MEMBRANAIRES .....	46
C. MODES DE FILTRATION.....	50
D. CRITÈRES D'ÉVALUATION DES PERFORMANCES LORS DE LA FILTRATION TANGENTIELLE DE SOLUTIONS BIOLOGIQUES. ....	53
E. APPLICATION DES TECHNIQUES MEMBRANAIRES AU FRACTIONNEMENT DE SOLUTIONS DE FRUCTANES .....	58

<b>IV. DÉMARCHE POUR L'INTÉGRATION DE LA TECHNOLOGIE MEMBRANAIRE DANS UN PROCÉDÉ INDUSTRIEL .....</b>	<b>61</b>
<b>CHAPITRE 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>	<b>63</b>
<b>I. MATÉRIEL BIOLOGIQUE.....</b>	<b>63</b>
A. AGUAMIEL .....	63
B. CŒUR ET FEUILLES D'AGAVE PULQUÉRO ET TEQUILANA .....	63
C. SOLUTION MODÈLE DES AGAVINES .....	64
D. JUS BRUT D'AGAVE TEQUILANA .....	64
<b>II. MÉTHODES ANALYTIQUES .....</b>	<b>65</b>
A. ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES .....	65
B. ANALYSE DES SUCRES .....	67
C. CARACTÉRISATION DES FRUCTANES .....	68
D. MÉTHODES ENZYMATIQUES .....	75
E. ANALYSES STATISTIQUES .....	76
<b>III. MÉTHODES DE FILTRATION.....</b>	<b>76</b>
A. LES MEMBRANES .....	76
B. LES UNITÉS DE FILTRATION .....	78
C. CARACTÉRISATION DES MEMBRANES .....	80
D. NETTOYAGE DES MEMBRANES .....	84
<b>CHAPITRE 3 RÉSULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>86</b>
<b>I. CARACTÉRISATION DE LA MATIÈRE PREMIÈRE : AGUAMIEL.....</b>	<b>86</b>
A. ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES D'AGUAMIEL.....	87
B. IDENTIFICATION ET QUANTIFICATION DES ACIDES AMINES .....	89
C. CARACTÉRISATION DES FRUCTANES DE L'AGUAMIEL.....	91
D. CONCLUSION.....	100
<b>II. CARACTÉRISATION DES FRUCTANES EXTRAITS DU CŒUR ET DES FEUILLES D'AGAVES .....</b>	<b>102</b>
A. EXTRACTION DES FRUCTANES À PARTIR DU CŒUR ET DES FEUILLES D'AGAVE PULQUÉRO... ..	102
B. COMPOSITION DES PRÉCIPITÉS OBTENUS À PARTIR DES FEUILLES ET DU CŒUR D'AGAVE PULQUÉRO .....	104
C. DÉTERMINATION DU PROFIL DE DISTRIBUTION DES MASSES MOLAIRES DES FRUCTANES EXTRAITS À PARTIR DU CŒUR ET DES FEUILLES D'AGAVE .....	105

D. POLYDISPERSITÉ DES FRUCTANES : MISE AU POINT D'UN GRADIENT EN CHROMATOGRAPHIE D'ÉCHANGE D'ANIONS. ....	107
E. BILAN.....	112
<b>III. CLARIFICATION ET FRACTIONNEMENT DES FRUCTANES D'AGAVES PAR TECHNOLOGIE MEMBRANAIRE.....</b>	<b>113</b>
A. ANALYSE DU PROCÉDÉ.....	113
B. CHOIX DES ÉTAPES DE SÉPARATION MEMBRANAIRES .....	115
C. VALIDATION DU PROCÉDÉ SUR SOLUTION MODÈLE .....	136
D. VALIDATION SUR SOLUTION RÉELLE .....	149
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>167</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>172</b>

## ***INTRODUCTION***

Le Mexique est le centre géographique d'origine de la famille des Agavaceae, on y retrouve 75 % des espèces existantes dans le monde (Cervantes-Martinez *et al.* 2002). Cela est sans doute dû à la situation géographique et aux conditions environnementales de ce pays. Plus de 90% des terres cultivables du Mexique, soit plus de 27 millions d'hectares se trouvent en effet dans des zones arides et semi-arides dans lesquelles seules les plantes cactacées, agavaceas et certaines succulentes peuvent pousser plus facilement en raison de leur capacité à résister à la sécheresse et au froid (Hinojosa 2004).

Les agaves étant l'une des rares plantes à se développer dans des conditions environnementales peu favorables, leur culture a représenté pour certaines communautés mexicaines une part économique importante. C'est en particulier le cas de l'agave pulquéro (*A. salmiana*, *A. mapisaga*, *A. atrovirens*, *A. americana* et *A. ferox*), qui présente plus de 100 utilisations possibles et surtout qui est à la base de la production de pulque : la plus ancienne boisson alcoolisée du continent américain (Steinkraus 1997). C'est également le cas de l'Agave *tequilana* W. cv *azul*, exploitée plus récemment pour la production de tequila, autre produit fortement associé à la tradition culturelle mexicaine.

Jusqu'en 1960, la production de pulque au Mexique était économiquement importante, mais avec l'introduction d'autres boissons alcooliques telles que la bière sur le marché mexicain, la consommation de pulque a chuté dramatiquement. La culture des agaves pulquéro s'est avérée de moins en moins rentable. Par conséquent, les surfaces consacrées à la culture de l'agave pulquéro ne représentaient plus en 2000 que 5% de celles dédiées à cette culture en 1960. (Abundis-Vargas 2007). Outre les problèmes liés à la migration des populations des campagnes vers les villes, cela pose également des problèmes environnementaux importants. La culture des agaves participe en effet à la protection de l'environnement en limitant l'érosion des sols.

En ce qui concerne la culture de l'*Agave tequilana*, le contexte est différent. Il existe toujours une demande importante de cette plante pour la production de tequila. Mais le manque de planification et de concertation ont conduit à une surproduction. En 2005, la confédération nationale des producteurs d'*agave tequilana* (CNPAT), avait prévu un excédent de 1,8 millions de tonnes d'*agave tequilana* pour les 4 années à venir. Les cours de cette matière première sont donc en forte chute.

Le gouvernement Mexicain se trouve donc confronter à deux problèmes : maintenir une culture favorable à l'environnement d'une part et garantir aux paysans une source de revenus suffisante. C'est pourquoi, des recherches visant à l'amélioration des procédés traditionnels d'une part et le développement de nouvelles alternatives pour revaloriser la culture d'*agave pulquéro* et utiliser le surplus de production de l'*Agave tequilana* d'autre part sont nécessaires.

Les premières recherches d'alternatives pour l'utilisation des agaves et de leurs dérivés se sont inspirées des procédés traditionnels et ont déjà dans certains cas, porté leurs fruits ou sont en voie d'être économiquement intéressantes au niveau industriel (pulque en canettes ; miel de maguey ; sirop de fructose et fructanes ; fibres d'agaves etc..). Parallèlement à ces différentes productions, il peut être envisagé d'utiliser l'aguamiel pour des applications en biotechnologie. En raison de la richesse de sa composition, l'aguamiel représente un substrat intéressant pour la culture de micro-organismes d'intérêt (Islas-Lopez *et al.* 2005; Martínez-Torres et Morales-Durán 2007; Rodriguez-Huezo *et al.* 2007). Mais l'aguamiel et plus spécifiquement les jus produits à partir du cœur des agaves semblent intéressants en raison de leur contenu polysaccharidique. Les agaves sont en effet des plantes stockant leur réserve énergétique sous forme de fructanes (Aspinall et Gupta 1959; Mancilla-Margalli et Lopez 2006).

Or les fructanes sont connus pour leurs propriétés prébiotiques (ils stimulent sélectivement la croissance et l'activité de bactéries bénéfiques dans le colon) et fonctionnels (ils fournissent des avantages au-delà de la nutrition de base, pouvant empêcher la maladie ou promouvoir la santé) (Van Loo *et al.* 1999; Roberfroid 2002a; Roberfroid 2007). Aujourd'hui en raison de l'explosion du marché des produits alimentaires fonctionnels, l'incorporation de fructanes est de plus en plus importante. De plus, l'ajout d'inuline permet d'augmenter la viscosité des produits alimentaires, donnant ainsi plus de "corps" et optimisant les propriétés



sensorielles des boissons de basses calories aussi bien que la texture des différents produits, yaourts, sauces de salade, mousses, chocolat, etc... (Aryana *et al.* 2007; Leite-Toneli *et al.* 2007; Gonzalez-Tomas *et al.* In Press).

Des travaux récents sur la caractérisation de jus extraits du cœur des agaves ont mis en évidence la présence de fructanes avec une structure très complexe (très branchée) par comparaison à celle de l'inuline de chicorée (Lopez *et al.* 2003; Mancilla-Margalli et Lopez 2006; Waleckx *et al.* 2008). Ces structures appelées « agavines », bien que plus complexes, présentent également des fonctions de prébiotiques et fonctionnelles (Urias-Silvas *et al.* 2007; Urias-Silvas et Lopez In press). Il peut donc s'avérer intéressant sur un plan économique de les purifier.

En général, à l'issue d'un procédé d'extraction de fructanes à partir d'une matière première végétale, on se trouve en présence d'un mélange complexe de molécules de fructanes dont le degré de polymérisation (DP) est très dispersé (3-60), ce mélange contenant également des résidus de fructose, glucose et saccharose, des sels, des lipides, des protéines et des acides aminés (Smits *et al.* 2001). Or les applications potentielles des fructanes et leur intérêt économique dépendent de leur degré de polymérisation et de leur degré de pureté. Il est donc indispensable de disposer de procédés de séparation permettant la clarification, le fractionnement et la purification de ces composés.

Diverses études consacrées au fractionnement d'inuline de chicorée font référence à différentes méthodes telles que la précipitation à l'éthanol ou par un mélange de solvants, la cristallisation, la chromatographie et enfin la filtration sur membranes. A l'issue de ces études, il semble que les techniques de filtration sur membrane soient l'une des voies les plus prometteuses pour le fractionnement des fructanes au niveau industriel. (Smits *et al.* 2001; Silver 2003; Moerman *et al.* 2004; Paseephol *et al.* 2007). Les techniques de filtration sur membranes poreuses permettent en effet de séparer les composants d'un mélange sur la base de leur taille, elles permettent de répondre aux 3 impératifs fixés à savoir la clarification, le fractionnement et la purification (Cheryan 1998).

Les travaux que nous avons entrepris s'inscrivent donc dans ce contexte. Il s'agit d'étudier les potentialités des technologies membranaires pour le fractionnement et la purification industrielle des fructanes, composants à haute valeur ajoutée du jus d'agave, ceci

afin de pouvoir à terme pérenniser la culture de ces plantes indispensables à l'économie et à l'environnement mexicains.

**Le premier chapitre** de cette thèse a pour objectif de présenter les différentes notions et concepts à la base de notre étude, il est divisé en trois sections consacrées respectivement à la présentation de la matière première (l'aguamiel et les jus d'agave), à la définition et aux propriétés des fructanes et à la présentation des techniques de séparation sur membrane. Enfin la démarche suivie pour l'intégration de technologies membranaires est décrite.

**Le second chapitre** présente les matériels et méthodes mis en œuvre pour mener à bien nos recherches.

**Le troisième chapitre** regroupe l'ensemble des résultats obtenus et comprend trois sections. La première est consacrée à la caractérisation de l'aguamiel au cours de la période de production, la seconde à la caractérisation des jus extraits des cœurs d'agave. La dernière partie concerne l'étude des procédés de clarification et de fractionnement du jus d'agave par filtration sur membrane, en vue de la production de 3 fractions d'intérêt différent, des fructanes de haut DP, des fructanes de DP intermédiaire et des fructo-oligosaccharides (FOS).

## **VALORISATION DES TRAVAUX DE RECHERCHE**

### **Publications :**

- Ortiz-Basurto, R. I.; Pourcelly, G.; Doco, T.; Williams, P.; Dornier M. ; Belleville, M.  
**P. Analysis of the main components of the aguamiel produced by the maguey-pulquero (*Agave mapisaga*) throughout the harvest period.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Published on web 04/23/2008
- Rosa Isela Ortiz-Basurto, Pascale Williams, Marie-Pierre Belleville, and Thierry Doco. **Presence of Rhamnogalacturonan II in the juices produced by Enzymatic Liquefaction of Agave pulquero.** *Carbohydrate Polymers, soumis*

### **Présentation de posters :**

- Ortiz-Basurto, R. I.; Pourcelly, G.; Doco, T.; Williams, P.; Dornier M. ; Belleville, M.  
**P. Componentes del aguamiel durante el periodo de producción del Agave pulquéro cultivado en la región de Tecamachalco, Puebla Mx.** 1er Congreso Nacional Agroindustrial, Alimentario y Biotecnológico. Tecamac, Estado de México, Mexique. 27-29 Septembre 2006.
- Ortiz-Basurto, R. I.; Pourcelly, G.; Doco, T.; Williams, P.; Dornier M. ; Belleville, M.  
**P. Fructans, Amino acids and physico-chemical characteristics of the aguamiel during the period of production of the Agave pulquéro.** 2ème Conference AIBan – Grenoble 2007. Grenoble, France. 11 et 12 mai 2007

### **Présentation orale :**

- Ortiz-Basurto, R. I. **Valorisation de produits végétaux naturels par des procédés à membranes: Exemple du jus d'agave.** Journée de l'Ecole Doctorale Science des Procédés Sciences des Aliments. Montpellier, France 20 Juin 2007.

## ***INSTITUTIONS IMPLIQUEES ET PARTENAIRES***

Le travail expérimental réalisé dans cette thèse n'a été possible que grâce à la contribution de plusieurs Instituts de Recherche de Montpellier (France), une Université et des producteurs d'aguamiel et de fructanes d'agave Mexicains. Ainsi :

1. les prélèvements des échantillons d'agave pulquéro et d'aguamiel ont été faits par le groupe de Technologie Alimentaire de l'Universidad Tecnológica de Tecamachalco en collaboration avec des producteurs d'agave pulquéro de Lomas de Romero, Acatzingo Puebla et la « Fundación Produce Puebla »,
2. le jus brut d'Agave tequilana et la solution modèle d'agavine ont été gracieusement fournis par l'entreprise Agaviotica S.A. de C.V. de Monterrey au Mexique,
3. tous les essais de filtration sur membranes et une partie de la caractérisation des échantillons ont été réalisés à l'Institut Européen des Membranes (IEM): UMR 5635, Place Eugène Bataillon - 34095 Montpellier, France au sein des équipes «Génie des Procédés Membranaires» (GPM) et « Transport Ionique et Electroséparations » (TIE),
4. la caractérisation des fructanes: extraction, identification et dégradation des polymères ainsi que la détermination de l'activité enzymatique dans l'aguamiel et le jus d'agave ont été réalisées à l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA): UMR 1083 « Sciences pour l'œnologie », au sein de l'équipe « Polyphénols et interactions » SupAgro,UM1, 2 Place Viala F-34060 Cédex Montpellier.
5. L'identification et la quantification des acides aminés ont été réalisées au Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD) : UMR 95 Qualisud, Montpellier SupAgro, 73 rue Jean-François Breton, TA B-95/16, 34398 Montpellier Cédex 5, France, Département PERSYST , Tropical Food Quality.

## **CHAPITRE 1 SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

### **I. GENERALITES SUR LES AGAVES ET LES JUS D'AGAVES**

Les agaves sont des plantes de grande importance économique dans les zones arides et semi-arides du Mexique, (Cervantes-Ramírez 2002). Remarquablement bien adaptées à cet environnement, certaines variétés d'agaves ont été exploitées par les premiers habitants de l'Amérique Centrale pour de multiples usages : fourrage, nourriture , boissons, médicaments, construction, tissage, papier,... (Granados-Sánchez 1993). Au cours du temps, la culture de certaines variétés d'agaves a représenté dans certaines communautés mexicaines une part économique de plus en plus importante, étant la seule culture possible dans des conditions environnementales peu favorables. C'est en particulier le cas de l'agave pulquéro, qui présente plus de 100 utilisations possibles et surtout qui est à la base de la production de pulque : première boisson alcoolisée du continent américain (Steinkraus 1997). C'est également le cas de l'Agave *tequilana* W. cv *azul*, exploitée plus récemment pour la production de tequila, autre produit fortement associé à la tradition culturelle mexicaine.

#### **A. TAXONOMIE DE L'AGAVE**

En 1753, Carl Linneus a établi le genre agave dont le nom provient du grec « *αγαθος* » qui signifie « digne d'admiration ». La famille des Agavacées a été proposée par Endlicher en 1836. Après 1960, les scientifiques ont proposé différents arrangements dans les familles Liliacées, Amaryllidacées et Agavacées, (Eguiarte 1995). Enfin, en 1997, Takhtajan a proposé une classification scientifique traditionnelle complète pour les agaves en considérant toutes les classifications antérieures (cf Tableau 1). Une classification plus simple a été proposée pour la classification phylogénétique par Angiosperms Phylogeny Group (APG,1998), qui place cette famille dans l'ordre des *Asparagales* directement rattachée au groupe des monocotylédones, (APG 1998).

Tableau 1 : Classification taxonomique des Agavacées selon (Takhtajan 1997).

Domaine :	<i>Eucaryotae</i>
Règne :	<i>Plantae</i>
Sous-règne :	<i>Viridaeplantae</i>
Phylum:	<i>Tracheophyta</i>
Sous-phylum:	<i>Spermatophyta</i>
Infra-phylum:	<i>Angiospermae</i>
Classe :	<i>Liliopsida</i>
Sous- classe :	<i>Liliidae</i>
Sur-Ordre :	<i>Lilianaes</i>
Ordre :	<i>Amaryllidacées</i>
Famille :	<i>Agavacées</i>
Sous-famille :	<i>Agavoideae</i>
Genre :	<i>Agave</i>
Espèce :	<i>spp (divers espèces)</i>

## B. REPARTITION GEOGRAPHIQUE DES AGAVES

L'agave est une plante endémique sur le continent américain, elle est présente du sud du Canada jusqu'au nord de l'Amérique du Sud et dans les îles Caraïbes. On la retrouve en particulier au Mexique et dans toute l'Amérique Centrale (García-Mendoza *et al.* 1995). L'amplitude de son rang écologique lui permet de se développer depuis le niveau de la mer, dans les dunes côtières, jusqu'aux bois localisés à 3300 m d'altitude, l'optimum étant situé entre 800 et 2500 m. Le Mexique est le centre géographique d'origine de la famille des Agavaceae qui inclut 288 espèces parmi lesquelles 166 sont des agaves. D'ailleurs, on retrouve au Mexique 125 espèces différentes d'agaves soit 75 % des espèces existant dans le monde. (Cervantes-Ramírez 2002).

## C. DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE ET REPRODUCTION DES AGAVES

La morphologie des agaves ressemble à celles des autres plantes appartenant au groupe des monocotylédones (aloès, nolinacea, broméliacea, xantorroea, dracénea, sansevieria, etc) (Eguiarte 1995). La morphologie typique des agaves s'illustre sur la Figure 1. La partie souterraine a la forme d'un rhizome et la partie aérienne présente un coeur qui supporte de longues et grandes feuilles fibreuses disposées en forme de rosette et se terminant en épine.

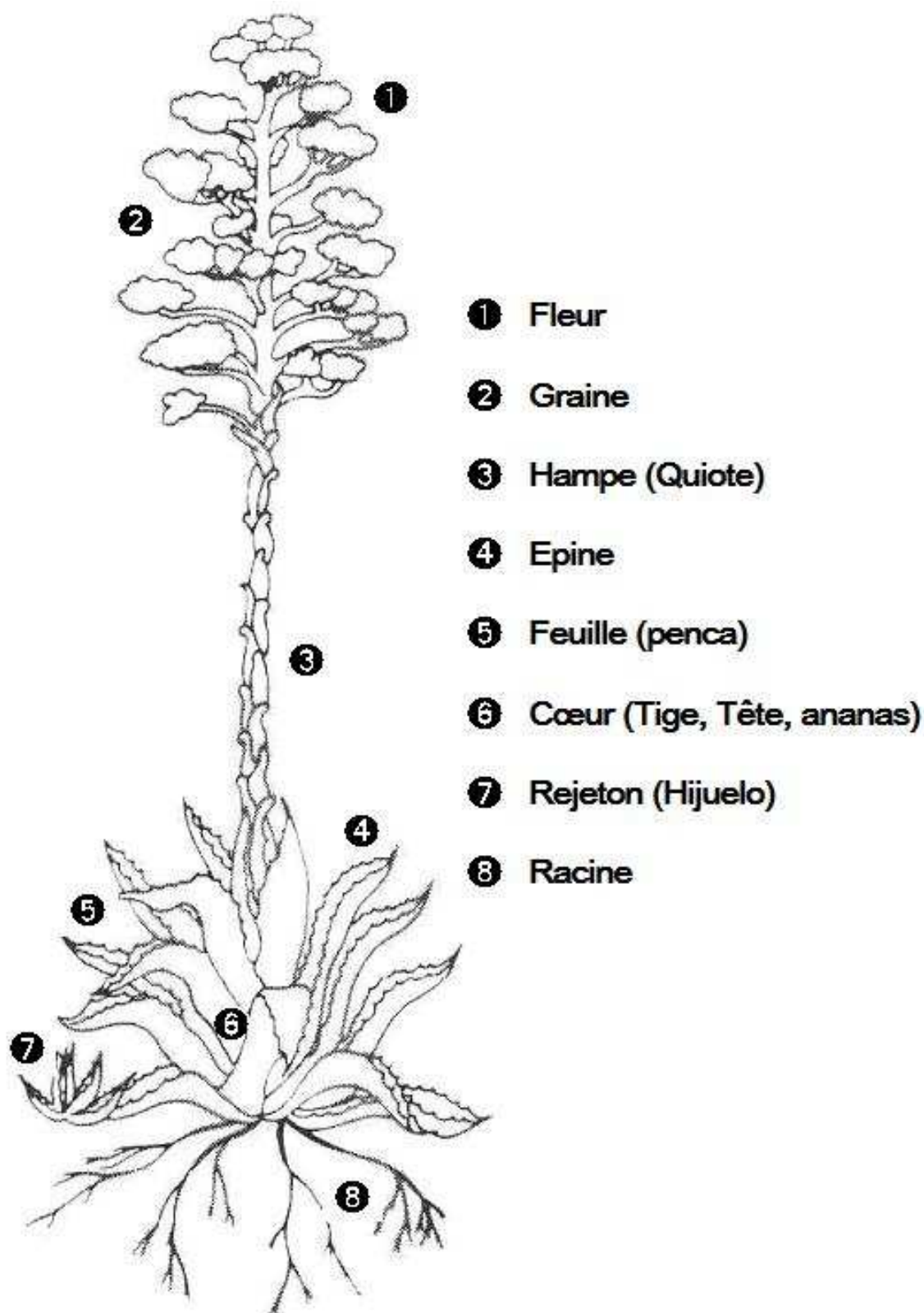


Figure 1 : Description morphologique de l'agave (maguey). Musée National des Cultures Populaires, México, Mexique). (Granados-Sánchez 1993).

Ces feuilles comprennent un parenchyme chlorophyllien (chlorenchyme) épais et recouvert d'une épaisse couche de cuticule cireuse. De ce fait, les agaves sont appelées plantes grasses ou encore plantes succulentes. Il s'agit donc de plantes particulièrement bien adaptées aux conditions semi-désertiques et ce d'autant plus que leurs racines, distribuées principalement dans les premiers centimètres du sol, ont la capacité d'absorber rapidement l'humidité. (Nobel et Bobich 2002). Le Tableau 2 dresse une comparaison des aspects morphologiques des agaves pulquéro et *tequilana* utilisées respectivement pour la production de pulque et de tequila.

**Tableau 2 : Comparaison des dimensions morphologiques des agaves *A. pulquéro* et *A. tequilana* (<sup>1</sup> Alfaro-Rojas, 2007; <sup>2</sup>(Alonso Gutierrez 2005); <sup>3</sup>(Nobel *et al.* 1998)).**

Caractéristiques	<i>A. pulquéro</i> <sup>1</sup>	<i>A. tequilana</i> <sup>2,3</sup>
<b>Hauteur de la plante (m)</b>	2,2 – 5,0	
<b>Nombre des feuilles</b>	34 – 46	
<b>Longueur des feuilles (m)</b>	1,6 – 2,9	1,25
<b>Largeur des feuilles (cm)</b>	27,2 – 39,6	8 - 10
<b>Nombre d'épines latérales</b>	50 - 105	
<b>Longueur de l'épine principale (cm)</b>	3,9 – 6,5	2
<b>Hauteur de cœur (cm)</b>		20-60
<b>Poids de cœur (kg)</b>	30 - 60	25 - 45

Les fleurs se trouvent au sommet de la tige, elles sont de couleur jaune-vert et possèdent un ovaire infère. Les agaves sont des plantes monocarpiques, c'est-à-dire qu'elles ne fleurissent qu'une seule fois et cet événement reproducteur conduit à leur mort (Freeman *et al.* 1977). Lors du démarrage de la floraison (qui peut avoir lieu au bout de 8 à 10 ans selon les espèces et les conditions climatiques) (Sánchez-Marroquín et Hope 1953), l'agave développe une grande inflorescence terminale connue botaniquement sous l'appellation de "hampe," (encore appelée *quiote* au Mexique), suite à l'allongement rapide du méristème apical après des années de croissance végétative de la rosette basique (Granados-Sánchez 1993). Les fleurs produisent un nectar abondant avec lequel elles attirent selon l'espèce concernée, soit des colibris soit des chauves-souris, ou encore des insectes, qui vont ainsi participer à la dissémination du pollen (Arrizaga *et al.* 2000).



Toutefois, même si la reproduction sexuée produit une grande quantité de semences, les conditions de germination ne sont pas toujours très favorables et la déperdition est forte. C'est pourquoi la reproduction des agaves est principalement végétative et asexuée. Ces plantes présentent en effet des groupes de rejetons basaux reliés par des rhizomes souterrains (Falk 2006). Chaque plante génère ainsi de 2 à 5 rejetons succulents par année (Figure 2).



**Figure 2 : Rejets des agaves autour de la plante mère (Reproduction asexuée).**

#### **D. RESERVES ENERGETIQUES DES AGAVES**

Les adaptations des plantes au milieu naturel se traduisent sur leur morphologie et leur physiologie. Parmi les stratégies d'adaptation aux conditions climatiques des zones arides se trouve la succulence. Les plantes succulentes ont en effet, la capacité de retenir dans leurs feuilles des quantités d'eau suffisantes à leur survie lors des périodes de sécheresse au cours desquelles leurs racines meurent par manque d'eau. Les agaves font partie de ce type de plantes, et sont classées dans la catégorie des *camefites*. Ce type de plantes possède un métabolisme adapté au milieu aride, appelé Métabolisme Acide Crassulacées (MAC), (Granados-Sánchez 1993; Nobel *et al.* 1998). Les agaves absorbent ainsi le CO<sub>2</sub> pendant la nuit lorsque les stomates sont ouverts et le fixent sous forme de composés à 3 et/ou 4 carbones sous l'action d'une enzyme : la phosphoénol-pyruvate-carboxylase. Ces composés s'accumulent dans les vacuoles du chlorenchyme, principalement sous forme d'acide malique, jusqu'au matin où les stomates se ferment. Durant le jour, grâce aux réactions photochimiques fournissant les molécules d'ATP et de NADPH nécessaires, ces acides organiques sont alors métabolisés au cours du cycle de Calvin libérant ainsi les molécules de dioxyde de carbone nécessaires à la synthèse des glucides dans les chloroplastes (José-Jacinto et Garcia-Moya 1995).

Les plantes chlorophylliennes synthétisent un grand nombre de composés organiques, fondamentaux ou secondaires. Lorsqu'ils ne sont pas consommés pour l'édification des divers tissus de la plante ou pour la respiration cellulaire, ces composés sont mis en réserve sous forme de fructanes dans le cas des agaves. Les fructanes sont des polymères solubles de fructose reliés à une molécule de saccharose terminale. Ils représentent les sucres de réserve chez 15% des espèces de plantes fleuries dont les agaves (Pollock et Cairns 1991; Pilon-Smits *et al.* 1995; Pilon-Smits *et al.* 1996; Wiemken 1996). Les fructanes sont synthétisés et stockés dans les coeurs d'agaves. Outre leur fonction de réserve de molécules en C3 et C4, les fructanes jouent aussi un rôle dans l'osmorégulation de la plante. Ils peuvent agir comme agents protecteurs contre la déshydratation lors des périodes de sécheresse ou de gel lors des périodes très froides (Wiemken *et al.* 1996). Une description plus détaillée de ces molécules est présentée dans la section II de ce chapitre.

## **E. PRINCIPALES UTILISATIONS DES AGAVES PULQUERO ET TEQUILANA**

Leur parfaite connaissance de la nature, acquise à l'époque préhispanique, a conduit les premiers mexicains à utiliser les agaves sous de multiples formes. A partir des feuilles, ils obtenaient des fils pour l'élaboration de sacs, tapettes, musettes, ceintures, filets de pêche et de cordes ; les feuilles complètes étaient utilisées comme tuiles pour couvrir leurs maisons; les épines étaient utilisées en guise d'aiguilles ou de clous. Les quiotes étaient employées pour la fabrication de poutres ou de piquets servant à délimiter des terrains. Avec les racines, ils élaboraient des brosses, des balais et des corbeilles. Enfin du cœur de la plante, ils extrayaient le jus (aguamiel), utilisé comme boisson pour les enfants et femmes enceintes mais à partir duquel ils obtenaient, après fermentation, le pulque : la boisson rituelle par excellence pour ceux-ci (Granados-Sánchez 1993; Ramírez 1995).

Actuellement, seules les productions de fibres à partir des *Agaves fourcroydes* et *sisaliana* plus connus sous le nom de « henequen et sisal », et de boissons alcoolisées à partir de jus d'agave persistent et représentent une activité économiquement importante dans les zones arides et semi-arides du Mexique. Concernant la production de boissons alcoolisées, on retrouve 3 régions différentes où sont cultivées les agaves pulquéro, les agaves mezcalero et les agaves tequilero destinées respectivement à la production de pulque, de mezcal et de la tequila comme on peut le voir sur la Figure 3.

Les variétés les plus utilisées pour la production de pulque (agaves pulquéro) sont : *A. salmiana*, *A. mapisaga*, *A. atrovirens*, *A. americana* et *A. ferox*, (Escalante *et al.* 2004 ; Alfaro-Rojas *et al.* 2007). Elles sont cultivées principalement sur le haut plateau central mexicain qui inclut les états de Hidalgo, Tlaxcala, Puebla et México.

Les agaves utilisées pour la production de mezcal (agave mezcalero) sont : *A. Angustifolia* Haw, *A. Esperrima* Jacobi, *A. Weberi* Cela, *A. Potatorum* Zucc y *A. Salmiana* Otto ex Salm. L'état d'Oaxaca est la seule zone de culture bénéficiant de « l'appellation d'origine mezcal » (DOM) (Valenzuela-Zapata 2007).

La seule variété autorisée pour la production de tequila pure, est l'*Agave tequilana* Azul, cultivée pour « l'Appellation d'Origine Tequila » (DOT) dans la Vallée de Tequila Jalisco, ainsi que dans les états de Guanajuato, Michoacan, Nayarit et Tamaulipas (Valenzuela-Zapata 2007).



Figure 3 : Distribution des principales zones de culture d'agaves d'intérêt industriel pour la production de boissons alcoolisées au Mexique.

## 1. Origine et procédé actuel de production du pulque

Quand les Espagnols sont arrivés sur le territoire mexicain, ils ont rapporté que certains indigènes produisaient une boisson légèrement alcoolisée (4-6 °GL) appelée « polihqui », qui était utilisée à des fins médicinales, religieuses ou encore était offerte comme stimulant aux victimes destinées au sacrifice. C'était la première boisson alcoolisée du continent américain, obtenue par la fermentation d'aguamiel, actuellement connue sous l'appellation de pulque (Steinkraus 1997 ; Steinkraus 2002).

### a. Préparation de la plante et extraction d'aguamiel

L'extraction d'aguamiel est réalisée lorsque les plantes âgées de 8 à 12 ans ont atteint leur pleine maturité et présentent des feuilles centrales dont la taille est supérieure à 1,5 m (Figure 4a ). Afin de profiter au mieux des réserves en sucres de la plante, la récolte doit avoir lieu avant la floraison généralement annoncée par l'ouverture des feuilles centrales (encore appelées meyolote) (Figure 4b).

Le paysan coupe alors le meyolote et forme un creux dans le cœur de l'agave (Figure 4c et 4d). A partir de ce jour là, et ce, toutes les 12h, le cœur d'agave est gratté avec un outil métallique au niveau du creux formé (Figure 4e) pour induire la sécrétion du jus ou aguamiel (Figure 4f) qui est récupéré avec une « acocote », (Figure 4g). Il s'agit d'un outil élaboré à partir de la coque sèche d'une large courge. Il présente des perforations à chacune de ses extrémités faisant ainsi fonction de grande pipette avec laquelle le paysan aspire l'aguamiel (Figure 4h, 4i). Après sa récolte, l'aguamiel de différentes plantes est rassemblé dans des tonneaux en bois pour être transporté au "tinacal" (Figure 4j).

Au moment de sa récolte, l'aguamiel est un jus translucide ambré, il présente un goût sucré et une odeur légèrement fruitée caractéristique de l'agave. Le volume de jus produit par pied d'agave et par collecte varie au cours de la période de production selon une courbe de type gaussien. La quantité maximale de jus collectée varie de 2 à 3 L par collecte soit 4 à 6L.jour<sup>-1</sup> et ce pendant une période de 4 à 6 mois.

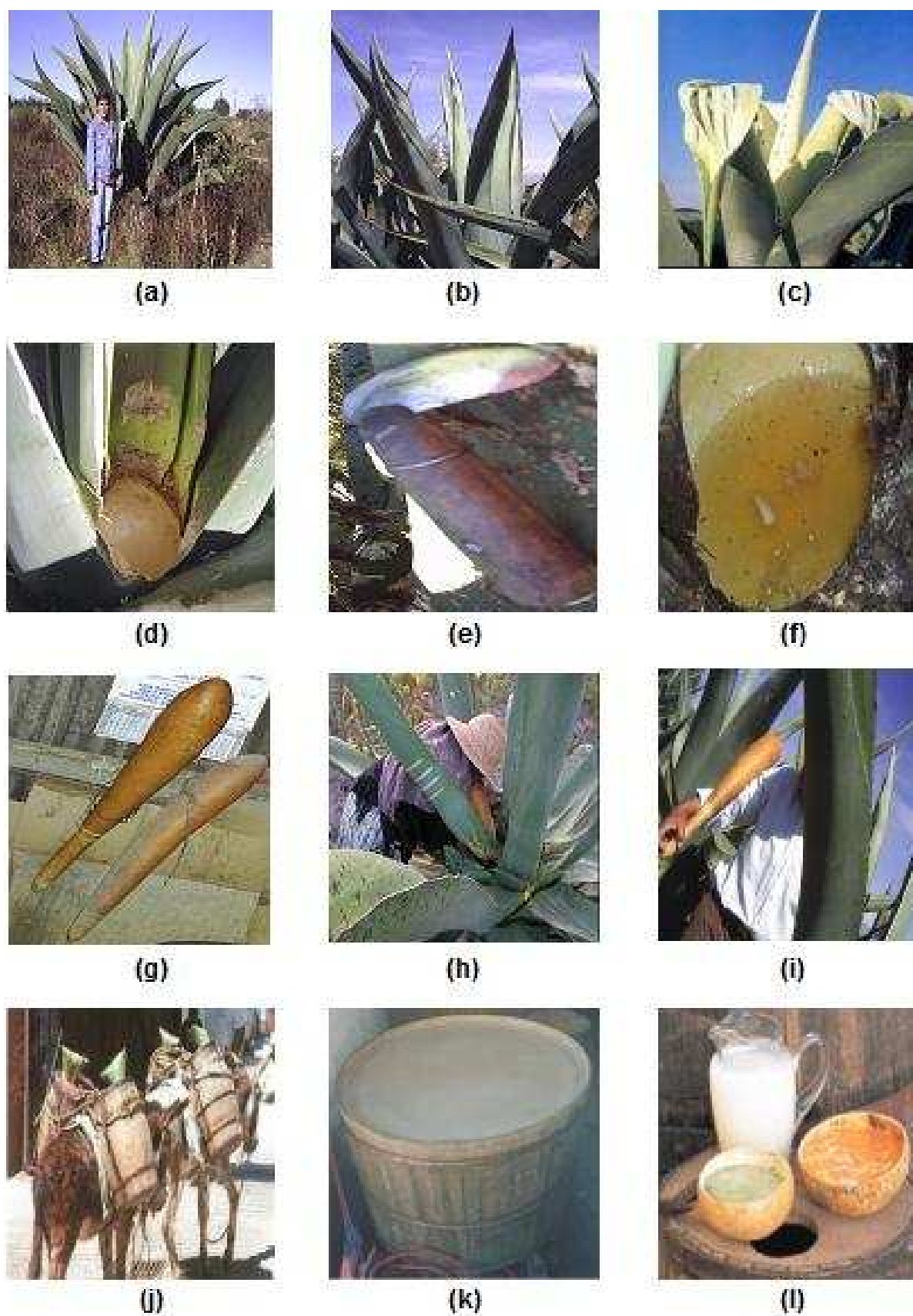


Figure 4 : Préparation d'agave pulquéro, récolte d'aguamiel et production de pulque.

b. Fermentation de l'aguamiel en vue de l'élaboration de pulque

Bien que la fermentation de l'aguamiel commence dès sa récolte puis lors de son transport grâce aux micro-organismes présents naturellement dans la plante, l'environnement et les tonneaux de transport (Figure 4f à 4j), la fermentation principale est réalisée au "tinacal" dans de grandes jarres en bois (Figure 4k). Elle est accélérée par addition d'une quantité de pulque précédemment produit. Ainsi la boisson est le résultat de l'action d'une grande diversité de bactéries mettant en œuvre simultanément des espèces telles que *Lactobacillus mesenteroides et dextranicum*, responsables de la viscosité de la boisson, mais aussi des levures telles que *Saccharomyces caribajali* et *Pseudomonas lindneri* responsables de la production d'alcool (Sánchez-Marroquín et Hope 1953; Escalante *et al.* 2004).

La durée totale de fermentation varie de 8 à 15 jours selon la température ambiante (la température idéale est de 28°C) et la concentration de micro-organismes inoculés. Le produit final, appelé pulque (Figure 4l) est un liquide d'apparence laiteuse translucide, légèrement visqueux, présentant une odeur citrique fruitée et une concentration en alcool comprise entre 4 et 6%. Le Tableau 3 rapporte la comparaison des principales caractéristiques physico-chimiques de l'aguamiel et du pulque.

**Tableau 3 : Comparaison de la composition de l'aguamiel et du pulque \*(Nmx-V-022 1972)\*\* (Nmx-V-037 1972).**

Caractéristique	Aguamiel *	Pulque**
pH	4,5 – 7,5	3,5 – 4,2
Indice de réfraction (20°C)	27 - 100	1,33 - 1,34
Solides totaux (g/100 ml)	7 - 17	
Sucres réducteurs totaux (g équivalent glucose/100 ml)	6 - 12	0,1 – 0,8
Sucres réducteurs libres (g équivalent glucose/100 ml)	2 - 3	
Gommes (g équivalent glucose/100 ml)	0.2 - 6	
Protéines (mg/100 ml)	100 - 600	
Cendres (mg/100 ml)	180 - 430	
Acidité (mg/100 ml) ac. Lactique	0,9 - 4	0,4 – 0,75
Degré alcoolique (%)		4 - 6

## 2. Origine et production de la tequila

La tequila et le Mezcal sont les principales boissons alcoolisées du Mexique et leur réputations mondiales ne sont plus à faire. La caractéristique principale de la tequila est qu'elle est produite uniquement à partir de l'*Agave tequilana*, la plante la plus populaire du Mexique. Dans la région d'appellation d'origine de Tequila, 8000 agriculteurs répartis sur 90000 hectares approvisionnent 105 entreprises productrices de tequila (Fundación Produce Jalisco, 2005).

### a. Préparation des coeurs d' agave tequilana pour la production de tequila

La récolte des *Agaves tequilana* encore appelée « jima », a lieu après 7 à 9 ans de croissance lorsque la plante a atteint sa maturité (Figure 5a), (Nobel *et al.* 1998). La plante est alors débarrassée de ses feuilles acérées, les "pencas" (Figure 5b). A l'aide d'un outil très tranchant appelé "la coa", le "jimador" (cultivateur d'agave) sectionne tout d'abord les racines affleurantes, déterre l'agave, puis la retourne et découpe le cœur qui ressemble à un ananas géant de 25 à 45 kg encore appelé « piña » ou « cœur d'agave » (Figure 5c).

### b. Cuisson des coeurs d'agave

Après avoir été coupés en deux ou quatre morceaux, les piñas sont chargés dans un grand four en brique ou en béton pour la cuisson qui dure entre 32 à 48 heures à une température voisine de 100 °C (Figure 5d). Ces fours traditionnels sont de plus en plus souvent remplacés par des autoclaves géants afin de réduire les temps de cuisson à seulement 6 heures grâce à une température de 121°C et une pression de 1,20 bar. C'est au cours de cette cuisson sous vapeur, que les fructanes de la plante sont hydrolysés en fructose qui sera transformé en alcool lors des étapes de fermentation ultérieures, (Cedeno 1995; Mancilla-Margalli et Lopez 2002; Waleckx *et al.* 2008).

### c. Extraction et fermentation du jus

Les piñas cuits sont pressés en présence d'eau afin d'en extraire le sucre des fibres (Figure 5e). Le jus est alors transféré dans de grandes citernes de 5000 à 50 000 litres (chez les grands producteurs) où a lieu la transformation des sucres en éthanol, aldéhydes, acides organiques et esters (Figure 5f), sous l'action des levures *Saccharomyces* principalement. La fermentation dure de 20 à 80 heures à température ambiante (environ 30 °C) (Cedeno 1995; Escalante *et al.* 2004; De Leon-Rodriguez *et al.* 2006; De Leon-Rodriguez *et al.* 2008 ; Diaz-Montano *et al.* 2008).





(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)



(g)



(h)



(i)

Figure 5 : Préparation d'Agave tequilana et production de tequila.



#### d. Distillation de la Tequila

Selon la loi mexicaine, cette distillation doit être réalisée en deux étapes. Tout d'abord, le jus fermenté appelé aussi "mosto " subit une première distillation dans un alambic en inox ou en cuivre (Figure 5g). On obtient un produit nommé "ordinario" dont le degré est compris entre 20° et 30° GL. On procède ensuite à la seconde distillation qui conduit à la tequila « *joven abocado* » ou « *gold* », 100 % agave pure dont la teneur en alcool peut atteindre jusqu'à 55°GL (Figure 5h). Ce produit doit au moins avoir vieilli 60 jours dans un fût de bois pour obtenir l'appellation *Tequila "reposado"*. Mais selon les producteurs, l'étape de vieillissement peut durer jusqu'à 12 mois, ce qui induit des arômes mais aussi des goûts différents. Selon le temps passé en fût, la Tequila est plus ou moins ambrée (Figure 5i) et son goût plus vanillé et épicé donc plus doux (remarque : du caramel peut y être ajouté afin de parfaire la coloration). Une tequila "añejo" est une tequila qui a passé de un à trois ans dans un fût de bois.

## **F. AVENIR DE LA CULTURE ET DES PRODUITS DERIVES D'AGAVES AU MEXIQUE**

### **1. Contexte socio-économique**

Jusqu'en 1960, la production de pulque était économiquement importante au Mexique. Narro-Robles (1992) a rapporté une consommation de 850 millions de litres par an, produits à partir d'une surface de culture de 55000 ha, l'état d'Hidalgo étant le principal état producteur avec une surface de culture de 26000 ha (Narro-Robles *et al.* 1992; Blomberg 2000). Avec l'introduction de la bière sur le marché mexicain, la consommation de pulque a dramatiquement chuté, en 1994 elle ne représentait plus que 11% de la consommation d'alcool totale, la bière représentant 54 % de la consommation. Actuellement, le prix du pulque (de 0,26 à 0,4 USD.L<sup>-1</sup>) ne rétribue plus le travail de production (Medina-Mora *et al.* 2000). En conséquence, la culture de l'agave pulquéro a considérablement diminué et en 2000 il ne restait plus dans l'état d'Hidalgo, que 1 200 ha cultivés, soit 4% des surfaces consacrées à la culture de l'agave en 1960. Dans certaines régions, les agaves ne sont plus plantées que sous forme de haies pour limiter les aires de cultures évitant ainsi l'érosion de la terre. D'après un rapport sur la production nationale de pulque en 2004, cette dernière ne représentait plus que 112000 L.mois<sup>-1</sup> dans l'état d'Hidalgo (70% de la production totale), 35000 L.mois<sup>-1</sup> dans

l'état de Tlaxcala et 17000 L.mois<sup>-1</sup> dans l'état de Mexico, l'ensemble de cette production représentant moins de 5 % de la production estimée en 1960 (Abundis-Vargas 2007).

En ce qui concerne la culture de l'*Agave tequilana*, le contexte est différent. Suite à de fortes gelées responsables en 1997 de la destruction de plantules d'*Agave tequilana* dans la zone d'appellation d'origine, de vastes programmes de plantation ont été mis en œuvre jusqu'en 2004 afin d'assurer une production suffisante pour approvisionner l'industrie de la tequila. Mais le manque de planification et de concertation ont conduit à une surproduction. En 2005, la confédération nationale des producteurs d'*Agave tequilana* (CNPAT), a prévu un excédent de 1,8 millions de tonnes d'agave tequilana pour les 4 années à venir.

Le gouvernement Mexicain se trouve donc confronté à deux problèmes :

- d'une part, il se doit de préserver l'existence de la culture du "Tlachique" (production d'aguamiel), en trouvant de nouvelles alternatives à l'utilisation de cette matière première, ceci afin d'éviter l'exode rural, de conserver la biodiversité et d'éviter la désertification des zones semi-arides.
- d'autre part, il lui faut trouver de nouvelles voies de valorisation de l'*Agave tequila* pour absorber les excédents de production et garantir aux paysans concernés des revenus acceptables.

C'est pourquoi dès l'an 2000, des recherches visant à développer de nouvelles alternatives pour l'utilisation de l'aguamiel et des agaves pulquéro ont été conduites notamment à l'Université Technologique de Tecamachalco (UTT) et ont permis l'émergence de nouveaux produits et de nouveaux débouchés pour les agaves.

## **2. Nouvelles alternatives pour l'utilisation des agaves**

Les premières recherches alternatives pour l'utilisation des agaves se sont inspirées des procédés traditionnels et ont déjà dans certains cas, porté leurs fruits ou sont en voie d'être économiquement intéressantes comme nous le rapportons ci-après.

a. Production de Pulque en canettes

Dès 1997, une petite entreprise mexicaine a entrepris des recherches pour standardiser la commercialisation de pulque en canettes afin de concurrencer la bière. En août 2006, cette entreprise était alors capable de produire 300000 canettes.mois<sup>-1</sup> de pulque aromatisé « pulque del Razo » ([http://imece.com.mx/noticia\\_20060912htm.htm](http://imece.com.mx/noticia_20060912htm.htm)).

b. Miel de Maguey

Très tôt, des associations de femmes habitant dans des zones rurales ont eu l'idée à l'échelle domestique, de concentrer l'aguamiel en vue d'obtenir un produit très sucré encore appelé « miel de maguey » [www.conaculta.gob.mx/.../06ene/indigenas.htm](http://www.conaculta.gob.mx/.../06ene/indigenas.htm). Des industriels se sont inspirés de ce procédé créant une entreprise (Agroindustrias FAROC) qui commercialise et exporte ce produit dont la qualité pourrait être grandement améliorée grâce à un procédé de clarification adapté.

c. Sirop de fructose et fructanes

En 1997, un brevet d'invention portant sur un procédé de production de sirop de fructose à partir d'agave a été déposé (Zuniga-Partida *et al.* 1997). Suite à ce brevet, des entreprises (Nekulti, Agaviotica, SA de CV, Nutra USA ingredientes, mieles unicornio, etc.) se sont intéressées à l'extraction et la production de fructanes à partir d'*Agave tequilana* principalement. Le procédé d'extraction utilisé par la société Agaviotica, SA de CV s'inspire de celui établi pour l'extraction d'inuline de chicorée. Il ne comporte aucune étape de fractionnement des inulines, ni de séparation des fructanes.

d. Sous-produits des fibres d'agaves

La bagasse, résidu fibreux obtenu suite à l'extraction des sucres de l'*Agave tequilana*, se présente sous forme d'amas de fibres brunes/jaunes dont une petite partie est utilisée dans des productions artisanales en tant que combustible, de matière première pour l'élaboration de briques, pour le rembourrage de sièges ou encore comme garniture de calage pour l'emballage de la vaisselle. D'autres utilisations ont été suggérées dans la littérature, à savoir son utilisation comme substrat pour la culture de champignon, comme matière

première pour la fabrication de panneaux composites thermopressés, la fabrication de papier ou encore la préparation de charbon actif. Alonso Gutierrez (2005) a proposé d'utiliser ces fibres en vue de la production de xylitol et d'éthanol.

Parallèlement à ces différentes productions, il peut être envisagé d'utiliser l'aguamiel pour des applications en biotechnologie (Islas-Lopez *et al.* 2005; Martínez-Torres et Morales-Durán 2007; Rodriguez-Huezo *et al.* 2005). En effet d'après le Tableau 3, il apparaît comme un excellent milieu de culture. Mais l'aguamiel et plus spécifiquement les jus produits à partir des coeurs d'agaves semblent intéressants en raison de leur contenu polysaccharidique, notamment de type fructanes, qui sont connus pour leurs propriétés prébiotiques (Martinez Del Campo Padilla 1999; Martínez-Torres et Morales-Durán 2007) ainsi que par la présence de métabolites secondaires dans le cœur d'agave pulquéro (les tanins, saponins, triterpène et flavonoides) présentant des effets bénéfiques pour la santé et le contrôle de maladies (Meixueiro-Valverde 2004; Andrade-Cetto et Heinrich 2005; Fernández-Anderson 2005).

Le développement d'un nouveau procédé de séparation visant à la purification de fructanes semble être une alternative intéressante pour favoriser la valorisation des sous produits des agaves. Pour cela, il est indispensable de mieux définir la composition et les structures de cette famille de composés. C'est ce à quoi, nous allons nous attacher dans la section suivante.

## II. LES FRUCTANES

### A. GENERALITES

Les fructanes sont des fibres alimentaires solubles parmi lesquelles on trouve des polysaccharides, des oligosaccharides et des substances végétales correspondant à la réserve glucidique des végétaux. Pour de très nombreuses espèces, l'amidon représente le glucide majoritaire de réserve, pour d'autres espèces comme la betterave (*Beta vulgaris*), ce rôle est rempli par le saccharose. Mais environ 12 à 15 % des végétaux supérieurs accumulent leurs glucides sous une troisième forme de réserve, les fructanes (Hendry, 1993).

Les fructanes, polymères de fructose hydrosolubles, ont été identifiés par Rose en 1804 dans les rhizomes d'aunée (*Inula helenium*), une dicotylédone de la famille des Astéracées (travaux cités par Pontis et Del Campillo, 1985). Depuis, les fructanes ont été répertoriés chez de nombreux genres de bactéries, chez de nombreuses espèces de végétaux supérieurs, et chez quelques genres de champignons (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*), d'algues et de bryophytes. Les espèces accumulatrices de fructanes couvrent environ un tiers de la surface végétale du globe et appartiennent aux familles d'angiospermes les plus évoluées (Hendry, 1993).

Ces structures ont été plus particulièrement étudiées chez cinq familles de dicotylédones (principalement chez les Astéracées représentant environ 25000 espèces) et dans deux familles de monocotylédones, les Liliacées et les Poacées. Dans le Tableau 4 est présentée une liste des espèces végétales accumulant des fructanes (Hendry et Wallace 1993; Campbell *et al.* 1997). Parmi les espèces accumulatrices de fructanes se trouvent des espèces importantes du point de vue économique comme des céréales (blé : *Triticum sp.*, orge : *Hordeum vulgare*, avoine : *Avena sativa*), des espèces utilisées pour l'alimentation humaine (chicorée : *Cichorium intybus*, oignon : *Allium cepa*), et des plantes ornementales (dahlia : *Dahlia variabilis*, tulipe : *Tulipa gesneriana*), (Hendry et Wallace 1993)

**Tableau 4 : Concentration en fructanes de quelques espèces végétales (d'après (Schorr-Galindo *et al.* 2000)).**

Inuline (% MH)	Végétaux	Espèce
15-25	Ail	<i>Allium sativum</i>
15-20	Salsifis	<i>Scorzonera hispanica</i>
15-20	Yacon	<i>Polymnia sonchifolia</i>
15-20	Racine de la Chicorée	<i>Chicorium intybus</i>
15-20	Topinambour	<i>Helianthus tuberosus</i>
15-20	Tubercule du Dahlia	<i>Dahlia sp.</i>
10-15	Racine d'asperge	<i>Asparagus officinalis</i>
10-15	Poireau	<i>Allium porrum</i>
8-13	Murnong	<i>Microseris scapigera</i>
2-6	Artichaut	<i>Cynara scolymus</i>
2-6	Oignon	<i>Allium cepa</i>
0,7	Seigle	<i>Secale cereale</i>
0,4	Blé	<i>Triticum durum</i>
0,3	Banane	<i>Musa sp</i>

% MH : % par rapport à la matière humide

Chez les végétaux, les fructanes sont synthétisés dans la vacuole à partir du saccharose cytoplasmique, grâce à l'action d'enzymes spécifiques (fructosyltransférases et invertases). Une première enzyme initialise la synthèse de fructanes par transfert d'un résidu de fructose sur une molécule de saccharose formant ce que l'on appelle le 1-Kestose. Ensuite une autre enzyme de type fructosyltransférase transfère de nouveaux résidus de fructose sur une molécule de fructane de DP supérieur ou égal à 3 allongeant ainsi la molécule. La synthèse de fructanes est modulée par la lumière qui influe sur la disponibilité du saccharose au sein de la cellule.

Un des rôles du métabolisme des fructanes serait de réguler la concentration cytosolique en saccharose. En effet, chez les plantes, les assimilats carbonés issus du processus de photosynthèse sont transportés sous forme de saccharose vers les tissus où ils vont être utilisés ou stockés. Toutefois, en raison de problèmes liés à l'augmentation de la pression osmotique intracellulaire, le saccharose ne peut s'accumuler indéfiniment. Lorsque la concentration en saccharose devient trop importante, l'excès de résidus saccharose va être utilisé pour synthétiser des fructanes. Moins actifs que le saccharose d'un point de vue osmotique, ces derniers vont pouvoir s'accumuler à de plus hautes concentrations que le

saccharose sans que le pouvoir réducteur ni que l'osmolarité de la cellule soient modifiés de façon significative. (Van Laere et Van Den Ende 2002).

De plus, à la différence des autres polysaccharides de réserve, les fructanes sont hydrosolubles et possèdent une forte capacité de rétention de l'eau en raison de leur nombre important de groupements hydroxyles. Cette particularité structurale suggère que les fructanes soient impliqués dans les mécanismes d'osmoprotection, basés sur l'association étroite entre solutés et composés tels que les protéines et les lipides membranaires (Serraj et Sinclair 2002).

A ce titre, ils vont permettre aux plantes d'ajuster leur potentiel osmotique au cours des différentes phases de leur développement mais aussi lors de leur exposition à des conditions extrêmes. Il a été rapporté que la concentration en fructanes augmente dans les tissus en réponse à la sécheresse ou aux basses températures (Pilon-Smits *et al.* 1995; Koops et Jonker 1996; Puebla *et al.* 1997; Wei et Chatterton 2001). De plus, il a été vérifié que l'accumulation des fructanes due au froid, c'est-à-dire lorsque la plante est soumise à des températures proches ou inférieures à 10°C, a lieu en supplément et non en remplacement des autres formes de mise en réserve des glucides tels que l'amidon ou le saccharose (Chatterton *et al.* 1989). C'est sans doute pour résister aux conditions climatiques caractérisées par des périodes saisonnières de froid et de sécheresse que les Poacées des zones tempérées et arides synthétisent toutes des fructanes (Chatterton *et al.*, 1989; Hendry et Wallace 1993)).

## B. DEFINITION ET STRUCTURE

Les fructanes sont des oligomères ou des polymères de fructose construits à partir d'une molécule de saccharose. Ils contiennent un résidu de D-glucose et  $n$  résidus de D-fructose sous forme furane, leur degré de polymérisation (DP) est égal à  $n+1$ . Les résidus sont liés entre eux par des liaisons O-glycosidiques soit en  $\beta$ -(2→1) soit en  $\beta$ -(2→6) qui engagent systématiquement le carbone 2 du fructose terminal portant la fonction réductrice. Les fructanes sont donc des glucides non réducteurs. La taille des fructanes qui est proportionnelle au nombre de monomères qui les compose, s'exprime généralement en degré de polymérisation (DP), celui ci peut varier de 3 à 60 résidus de fructose. Si le DP est inférieur à 10, ces polymères sont connus comme fructo-oligosaccharides (FOS), mais si le DP est

supérieur à 10, ils sont appelés polyfructanes (Itaya *et al.* 1997; Corradini *et al.* 2004), le représentant le plus connu des polyfructanes étant l'inuline, découverte dans les rhizomes d'une dicotylédone de la famille des Astéracées *Inula helenium* par Rose en 1804, (Pontis et Del Campillo 1985).

La structure des fructanes dans les végétaux varie selon l'espèce végétale mais aussi en fonction des conditions climatiques de son environnement (Vijn et Smeekens 1999; Kocsis *et al.* 2007). Les fructanes sont classés en quatre groupes majeurs en fonction des liaisons glycosidiques reliant les résidus fructofuranosyles entre-eux.

#### ➤ Les fructanes de type « Inuline »

Les inulines sont des fructanes linéaires avec des liaisons  $\beta(2\rightarrow1)$  entre les unités de fructose et leur glucose est en position terminale. Le 1-kestotriose, également appelé isokestose, est la plus petite molécule représentante de la famille des inulines (Figure 6A). Ce type de molécule correspond aux fructanes trouvés chez les dicotylédones (chicorée, topinambour : *Helianthus tuberosus*, pissenlit : *Taraxacum officinale*, artichaut : *Cynara scolymus*) et chez quelques monocotylédones, appartenant à l'ordre Asterales (Koops et Jonker 1996).

#### ➤ Les fructanes de type « Lévané »

Les lévanes sont également des fructanes linéaires mais constitués par l'enchaînement de résidus fructose liés en  $\beta(2\rightarrow6)$  et leur glucose est en position terminale. On les trouve principalement chez les monocotylédones et les bactéries. En général, les bactéries produisent des molécules de lévane avec un DP de plus de 100 000 unités de fructose (Figure 6C) (Vijn et Smeekens 1999).

#### ➤ Les fructanes de type « Néoséries »

Les fructanes de ce type sont synthétisés à partir du 6G-kestotriose (ou néokestose), le résidu glucose se retrouve donc à l'intérieur de la molécule. Lorsque les liaisons entre les résidus fructosyles sont de type  $\beta(2\rightarrow1)$ , on parle de fructanes de type « néosérie inuline », mais si les liaisons entre les résidus fructosyles sont de type  $\beta(2\rightarrow6)$ , on parle alors de



fructanes de type « néosérie lévane ». Les unités fructose supplémentaires viennent se fixer sur l'un des deux résidus fructose terminal du 6G-kestotriose par des liaisons  $\beta(2\rightarrow1)$  (fructanes de la néosérie inuline) ou par des liaisons  $\beta(2\rightarrow6)$  (fructanes de la néosérie lévane).

### ➤ Les fructanes de type « Graminanes »

Les fructanes de cette famille sont des polymères mixtes et branchés dont la structure est plus ou moins complexe. En général, le résidu fructose du saccharose est substitué à la fois par une chaîne de résidus fructose liés en  $\beta(2\rightarrow6)$  et par une chaîne de résidus fructose liés en  $\beta(2\rightarrow1)$ . Le résidu glucose peut être en position terminale mais il peut être lui aussi substitué par une chaîne de résidus fructose liés en  $\beta(2\rightarrow1)$ . Enfin les chaînes de fructanes peuvent elles-mêmes être branchées si l'un de leurs résidus fructose est disubstitué. On retrouve ce type de structure plus spécifiquement chez les graminées, (blé et l'orge). Un exemple de ce type de fructane branché est la molécule de bifurcose (1,6-kestotétraose) (Figure 6D) (Bonnett *et al.* 1997).

Les végétaux peuvent accumuler des fructanes appartenant à un seul ou plusieurs de ces quatre types de structures. Dans la famille des Astéracées, le topinambour (*Helianthus tuberosus*) accumule uniquement des fructanes de type inuline. Par contre, la chicorée et le dahlia accumulent majoritairement des fructanes de type inuline mais aussi des fructanes de type lévane (Carpita *et al.* 1989 ; Bonnett *et al.* 1994). Cette famille a aussi la particularité d'accumuler des fructanes exclusivement composés de résidus fructosyles (Ernst *et al.* 1996). Ces fructanes sont synthétisés à partir d'un fructose à la place du saccharose et sont appelés inulo-*n*-ose (Van Den Ende et Van Laere 1996). Ces fructanes sont donc des glucides réducteurs car la fonction cétone du premier résidu fructosyle de la chaîne est libre.

Les Liliacées tels que l'oignon possèdent des fructanes de type inuline et de type néosérie inuline (Ritsema et Smeekens 2003a ; 2003b). C'est chez les Poacées que la structure des fructanes accumulés est la plus complexe. En effet, les fructanes présents chez cette famille peuvent appartenir aux quatre types décrits précédemment (Bonnett *et al.* 1997). Généralement les Poacées affichent une prédominance de liaisons  $\beta(2\rightarrow6)$  (Chatterton *et al.* 1990 ; Bancal *et al.* 1992), sans toutefois exclure la présence de liaisons  $\beta(2\rightarrow1)$ .

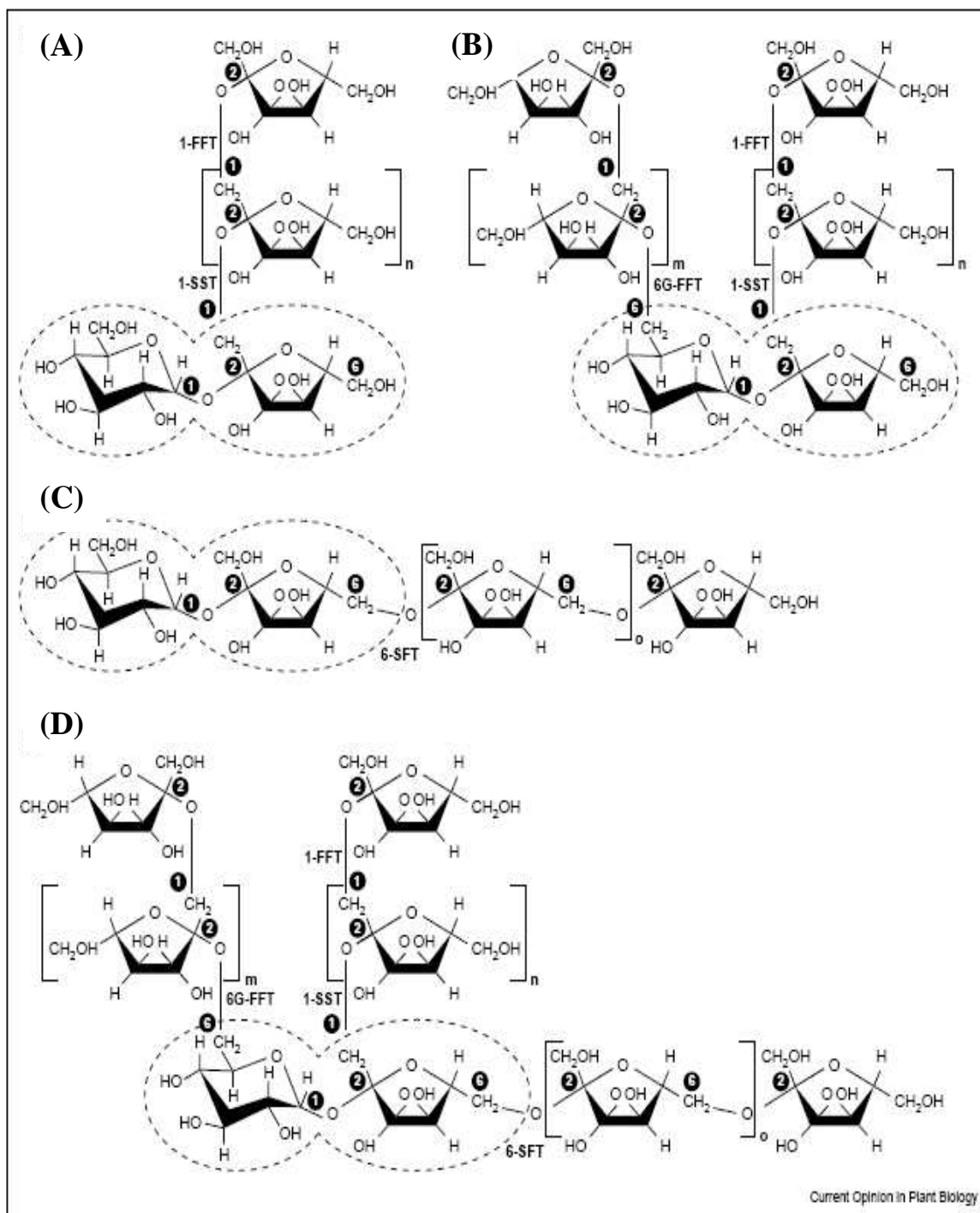


Figure 6 : Structure des fructanes ((A) type inuline, (B) type néoséries inuline, (C) type lévane et (D) type graminane). La molécule de saccharose est entourée en pointillés et les numéros dans un rond noir correspondent aux liaisons glycosidiques entre les différents monosaccharides (Ritsema et Smeekens 2003a).

Les agaves, plantes *Liliacées* monocotylédones sont aussi un exemple dans lequel les fructanes sont les principaux glucides de réserve, ils sont synthétisés et stockés dans le cœur de la plante. La structure des fructanes chez l'*Agave tequilana* W. cv *azul* et l'*A. americana* a été considérée comme étant de type inuline (Sánchez-Marroquín et Hope 1953; Bathia et Nandra 1979; Wang et Nobel 1998). Mais d'autres chercheurs (Aspinall et Gupta 1959; Satyanarayana 1976; Dorland *et al.* 1977), signalent dans l'*Agave veracruz*, un mélange complexe de fructanes présentant un grand nombre de branchements, des unités glucoses internes et des liaisons de type  $\beta$ -(2→1) et  $\beta$ -(2→6). Enfin, (Wang et Nobel 1998) ont décrit chez l'*A. deserti*, la présence dans le tissu vasculaire de la plante, de FOS avec des unités glucose internes et un DP de 5.

Des travaux récents sur la caractérisation de jus extraits des coeurs d'*Agave tequilana*, *A. angustifolia*, *A. fourcroydes*, *A. potatorum* et *A. cantala*, ont mis en évidence la présence de fructanes de type graminane mais présentant une structure très complexe car très branchée (Mancilla-Margally et Lopez 2006; (Lopez *et al.* 2003; Waleckx *et al.* 2008). Mancilla-Margally et Lopez ont proposé le nom de graminanes branchés ou agavines pour caractériser les fructanes isolés à partir d'agave. Une représentation schématique de la structure des agavines est donnée sur la Figure 7. Les agavines ont un DP compris entre 3 et 29 et représentent entre 60 et 85 % du total des carbohydrates solubles dans l'eau et de 15 à 40 % des sucres (saccharose, glucose et fructose). La flexibilité métabolique de ces molécules leur permet facilement de se polymériser et dépolymériser en glucides solubles selon l'étape de développement des agaves et des conditions environnementales.

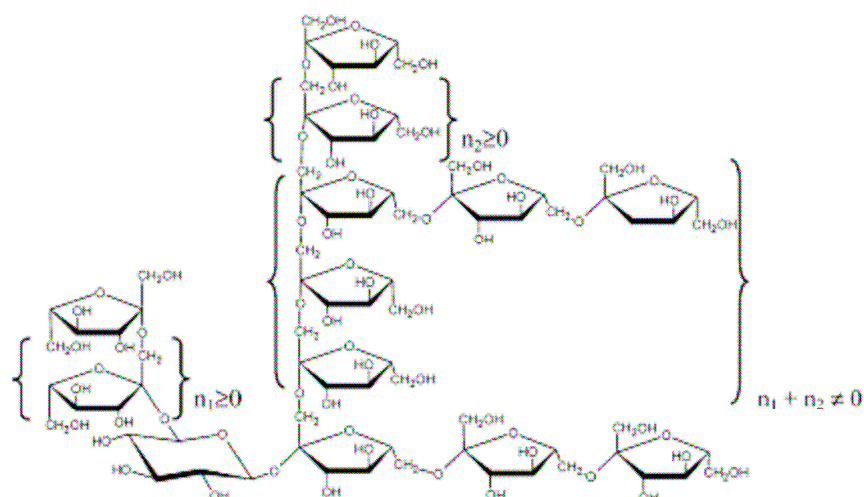


Figure 7 : Structure des fructanes de la famille Agavine d'après (Mancilla-Margalli et Lopez 2006).

### C. EFFETS PHYSIOLOGIQUES DES FRUCTANES COMME PREBIOTIQUES

Les fructanes, comme toutes les fibres alimentaires ne sont ni digérés au niveau de l'estomac ni adsorbés dans l'intestin grêle, mais ils subissent une fermentation partielle ou totale dans le côlon. Ils sont donc considérés comme bénéfiques pour la santé à plusieurs titres.

D'une part, ils participent au bon fonctionnement du côlon. Ils contribuent, en augmentant la fréquence et le volume des selles, au soulagement des symptômes de la constipation (Dysseler et Hoffem 1995 ; Cherbut 2002 ; Praznik *et al.* 2002 ). Mais aussi, comme l'ingestion de fibres augmente l'effet de satiété, ils participent à l'efficacité des régimes pour les personnes en surpoids.

D'autre part, les fructanes sont considérés comme des aliments fonctionnels ou prébiotiques c'est-à-dire comme des aliments qui fournissent des avantages au-delà de la nutrition de base, pouvant empêcher la maladie ou promouvoir la santé. N'étant ni digérés, ni absorbés avant leur arrivée dans le côlon, les fructanes vont servir de substrat pour la flore intestinale. Or cette microflore semble jouer un rôle important sur la santé et le bien-être immédiat et à long terme chez les adultes et les nourrissons (Bruzzes *et al.* 2006).

En raison des préoccupations de santé et de bien être des consommateurs, de nombreuses études ont été consacrées ces dernières années aux rôles de la flore intestinale et à l'impact d'aliments dits prébiotiques sur cette même flore.

Ainsi, des travaux scientifiques suggèrent que l'ingestion de prébiotiques limite le développement de bactéries pathogènes intestinales, qu'elle a un rôle favorable sur le système immunitaire et limite le développement de maladies allergiques (Kolida *et al.* 2002 ; Roberfroid 2002a ; Roberfroid 2002b ; Kolida et Gibson 2007; Roberfroid 2007 ).

Parmi les aliments prébiotiques, les fructanes tant les inulines que les FOS, sont classés comme prébiotiques modèles en raison de leurs effets bénéfiques sur la croissance de *Bifidobacteria* principalement. Ils auraient une action positive sur la suppression des bactéries pathogènes putréfactives et permettraient également la réduction des concentrations en cholestérol dans le sérum sanguin (Pool-Zobel *et al.* 2002 ; Guarner 2005 ; Kolida et Gibson 2007; Roberfroid 2007 ; Seifert et Watzl 2007 ; Tuohy 2007 ).

La consommation d'inuline et de FOS permettrait également d'augmenter la biodisponibilité du calcium. En effet, les acides gras à chaînes courtes formés au cours de leur dégradation par la flore intestinale entraînent une baisse du pH luminal, favorable à l'ionisation du calcium, celui-ci est alors absorbé plus facilement par diffusion passive (Abrams *et al.* 2005; Abrams *et al.* 2007; Coxam 2007; Holloway *et al.* 2007)

Un impact favorable sur la réduction des risques de cancer colorectal a été aussi rapporté : le butyrate, un acide gras à courtes chaînes produit de la fermentation des fructanes favorise l'installation d'une flore intestinale équilibrée. La création d'un milieu acide dans le gros intestin diminue alors les possibilités d'adhésion des substances carcinogènes à la surface des cellules intestinales et favorise ainsi des conditions qui ralentissent sérieusement le développement tumoral (Pool-Zobel *et al.* 2002 ; Pool-Zobel 2005; Kim et Milner 2007; Pool-Zobel et Sauer 2007; Rafter *et al.* 2007).

En ce qui concerne les fructanes de type « Agavine », ces structures bien que plus complexes, présentent également des fonctions de prébiotiques (Urias-Silvas et Lopez In press). Il a été rapporté récemment que les agavines et les inulines d'agave contrôlèrent la glycémie et l'homéostasie lipidique (contrôle du taux de cholestérol). Les auteurs soulignent l'influence positive de ces deux types de fructanes sur le contrôle de l'appétit (due à la modulation des peptides gastro-intestinaux) et donc sur la régulation du poids corporel. Ces fructanes pourraient être intéressants pour le contrôle de l'obésité. (Urias-Silvas *et al.* 2007).

Comme le potentiel prébiotique des fructanes issus d'agaves est similaire à celui des fructanes de type inuline, un nouveau débouché s'ouvre pour cette matière première. Des études et le développement d'applications allant dans ce sens sont déjà en cours au Mexique et en partenariat avec des laboratoires français.

#### **D. PRINCIPALES APPLICATIONS DES FRUCTANES EN INDUSTRIE ALIMENTAIRE**

Initialement, l'utilisation des fructanes de type inuline dans l'industrie alimentaire a été limitée à la production de café, en raison du goût amer produit lors du procédé d'extraction (Dykins et Englis 1933), par réaction de Maillard (Villard *et al.* 2003) ou induit par la caramélisation des fructanes (Loehmar 1996). Depuis, une grande diversité d'applications a été trouvée pour les fructanes (Leite-Toneli *et al.* 2007). Par exemple, du fait de ses propriétés physico-chimiques, l'inuline peut être utilisée comme additif dans l'industrie alimentaire et notamment se substituer aux sucres et aux graisses dans les produits à faibles teneur en calories.

Les fructanes sont en effet stables aux pH trouvés dans la majorité des aliments (pH 4-7), ainsi qu'aux basses et hautes températures (Huebner *et al.* 2008). Le point de fusion de l'inuline pure sous forme cristalline est supérieur à 199°C. Dépourvue d'arômes, très soluble (sa solubilité dans l'eau varie respectivement de 60 et 330 g.L<sup>-1</sup> lorsque la température passe de 10 à 60 °C), cette fibre alimentaire peut être incorporée dans tous les produits alimentaires sucrés ou salés. C'est un ingrédient alimentaire répondant à une demande précise du marché actuel: matière première naturelle, apport en fibres alimentaires, allègement en sucre et en graisses (Bigot 1997; Leite-Toneli *et al.* 2007). Toutefois, en tant que fibre et sous forme de poudre, le pourcentage d'inuline dans un produit ne devrait pas, semble-t-il, être supérieur à 15 %, sinon la sensation en bouche risque de devenir «sableuse» (Bigot 1997; Flickinger et Fahey 2002; Yun 2003; Verdonk *et al.* 2005; Roberfroid 2007).

En tant que molécule très hydrophile, l'inuline a une grande capacité à retenir l'eau au sein de l'aliment où elle est incorporée, lui conférant ainsi une texture plus moelleuse. Cette capacité de rétention induit également des changements des propriétés rhéologiques et principalement de viscosité. De plus, grâce à son pouvoir de rétention d'eau, l'inuline

contribue à améliorer la stabilité des émulsions et des aliments (Vervoort *et al.* 1999; Van Den Mooter *et al.* 2003; Yun 2003; Tseng *et al.* 2008).

Des études ont montré que les interactions entre l'inuline et les hydrocolloïdes des produits alimentaires dérivés du lait conduisent à l'obtention de produits présentant une meilleure texture (Gonzalez-Tomas *et al.* In Press; Tárrega et Costell 2006; Akin *et al.* 2007; Villegas et Costell 2007; Silva 1996). C'est pourquoi, l'inuline est beaucoup utilisée en tant que substitut de matière grasse pour la fabrication de produits laitiers allégés. Son intérêt en tant qu'analogue de matière grasse est essentiellement associé à sa capacité à produire une texture semblable à la crème. Elle confère ainsi de l'onctuosité à l'aliment allégé tout en n'apportant que très peu d'énergie : 4 à 10 kJ.g<sup>-1</sup> (soit 0 à 2,4 kcal par gramme) selon la longueur de la chaîne de fructanes. Elle contribue également à améliorer la stabilité des émulsions et des aliments foisonnés, des margarines au fromage frais en passant par les mousses au chocolat. L'ajout d'inuline à un fromage tartinable permet d'obtenir un produit à teneur réduite de 30 % en matière grasse tout en réduisant son coût de formulation de 10 % (Dutcosky *et al.* 2006; Aryana *et al.* 2007; Donkor *et al.* 2007).

L'ajout d'inuline permet aussi d'augmenter la viscosité, donnant ainsi plus de "corps" et optimisant les propriétés sensorielles des boissons basses calories aussi bien que la texture des différents produits, yaourts, sauces de salade, mousses, chocolats, etc supplémentés (Aryana *et al.* 2007; Leite-Toneli *et al.* 2007; Gonzalez-Tomas *et al.* In Press).

L'inuline peut également être utilisée en remplacement du sucre dans le chocolat, ce dernier peut alors revendiquer l'appellation «allégé en sucres» en raison du faible apport calorique de l'inuline.

Par ailleurs l'incorporation d'inuline dans les farines réduit la capacité d'absorption d'eau de ces dernières, les pâtes préparées à partir de ces farines sont moins visqueuses, leur manipulation est alors facilitée (Bigot 1997).

L'utilisation alimentaire des FOS est un peu différente. Tout comme l'inuline, ils sont incolores, présentent une faible « sucrosité » et leur arôme est neutre (correspondant à 10% du pouvoir sucrant du saccharose). Ils sont stables jusqu'à des températures proches de 140°C et quelques fractions de FOS présentent une capacité réductrice (Gennaro 2000). Ils

sont essentiellement utilisés pour l'élaboration d'aliments où la présence de saccharose est limitée, principalement dans les produits pour diabétiques et pour bébés (Yun 2003).

En conclusion, l'incorporation de fructanes dans l'alimentation est de plus en plus importante. En 1997, plus de 150 produits (dont une dizaine en France) formulés avec de l'inuline ou des FOS ont été commercialisés en Europe où l'inuline est considérée comme une fibre alimentaire. Au Japon où les FOS sont considérés comme des aliments et non pas comme des ingrédients alimentaires, on les retrouve dans plus de 500 produits de consommation courante. Ainsi la consommation journalière varie respectivement de 1 à 4 g aux USA, de 3 à 12g en Europe alors qu'au Japon, où l'absorption journalière des FOS est particulièrement importante, on suggère de ne pas dépasser les 45 g par jour afin d'éviter les risques de diarrhées (Spiegel *et al.* 1994; Lajolo et Wenzel De Menezes 2006; Roberfroid 2007).

## **E. PRINCIPALES ENTREPRISES COMMERCIALISANT DES FRUCTANES**

L'inuline provient majoritairement de la racine de *Chicorium intybus* en utilisant un procédé d'extraction similaire à celui du sucre à partir de betteraves sucrières. Elle est produite depuis le milieu des années 1800 par la société Cosucra. En 1997, les sociétés Cosucra et Orafti étaient les deux principales entreprises productrices d'inuline sous les marques respectives de Fibruline et Raftiline. Aujourd'hui, en raison de l'explosion du marché des prébiotiques dans l'alimentation (plus de 400 produits alimentaires prébiotiques ont été répertoriés en 2007), on retrouve plus de 20 sociétés produisant des oligosaccharides et des fibres utilisés comme prébiotiques. Les principales entreprises et la diversité des produits commercialisés sont présentées dans le Tableau 5.

D'après la FAO, le marché européen des prébiotiques a rapporté 87 millions d'€ en 2007 et devrait atteindre 179,7 millions d'€/an avant 2010. Cette croissance spectaculaire est en partie expliquée par l'augmentation de la diversité des produits alimentaires auxquels ces prébiotiques sont ajoutés (FAO 2007). En Amérique Latine, suite à l'implantation de la société Orafti au Chili en 2006, la production de fructanes de type inuline représente une quantité annuelle de 10 000 Tonnes. Au Mexique la production de fructanes à partir des agaves est réalisée principalement par la société AGAVIOTICA, S.A. de C.V. qui produit 8



tonnes/an d'un mélange d'agavines en poudre et un sirop de fructanes. Le produit FRUCTAGAVE PR 95 de la société AGAVIOTICA a été utilisé comme solution modèle au cours de cette thèse.

**Tableau 5 : Principaux produits commerciaux à base d'inuline et de fructanes.**

<b>Orafti</b> (Wallonie, Bruxelles et Chili)	<b>Sensus</b> (Roosendaal, les Pays-Bas)	<b>Cosucra</b> (Belgium et France)
<p><b>Beneo™ L95 , L85 et L60:</b> FOS sirop avec une concentration comprise entre 5 et 40% de sucres</p> <p><b>Beneo™ Synergie :</b> Oligofructoses enrichis en inuline, le mieux adapté pour des revendications « santé »</p> <p><b>Beneo™ HST:</b> Inuline très soluble avec un DP moyen de 10 et contenant 12 % de sucres</p> <p><b>Beneo™ ST:</b> Inuline en poudre avec un DP moyen <math>\geq 10</math> et contenant 8 % de sucres</p> <p><b>Beneo™ GR:</b> Inuline granulée avec un DP moyen <math>\geq 10</math> et contenant 8 % de sucres</p> <p><b>Beneo™ ST gel:</b> Inuline en gel avec un DP moyen <math>\geq 10</math> et contenant 8 % de sucres</p> <p><b>Beneo™ HP gel:</b> Inuline haute performance en gel avec un DP moyen <math>\geq 23</math> sans sucre</p> <p><b>Beneo™ HP et HPX:</b> Inuline haute performance pour le remplacement des graisses à basses températures (HP) et à hautes températures (HPX) avec un DP moyen <math>\geq 23</math> sans sucre</p> <p><a href="http://www.beneo-orafiti.com">http://www.beneo-orafiti.com</a></p>	<p><b>Frutalose® l60 :</b> FOS sirop hautement sucré, idéal en remplacement du sucre</p> <p><b>Frutalose® l85 :</b> FOS sirop très riche en fibres et très sucré utilisé pour l'enrichissement en fibres et en remplacement du sucre</p> <p><b>Frutalose® l92 :</b> FOS sirop contenant un maximum de fibres , excellent pour l'enrichissement en fibres et en remplacement du sucre.</p> <p><b>Frutafit® clr :</b> inuline/fructo-oligosaccharides ; poudre de très haute solubilité.</p> <p><b>Frutafit® hd :</b> inuline standard en poudre fortement dispersable</p> <p><b>Frutafit® iq</b> version instantannée d'inuline en poudre</p> <p><b>Frutafit® tex :</b> longues chaînes d'inulines sans sucre avec d'excellentes propriétés sur la texture</p> <p><a href="http://www.foodnavigator.com">http://www.foodnavigator.com</a></p>	<p><b>Fibruline :</b> inuline avec 90 % de fibres diététiques et 10% de solubilité minimale 1,2 kcal/g.</p> <p><b>Fibrulose f97 :</b> 97 % de FOS de chicorée sans aucun effet sur la texture 1,1 kcal/g.</p> <p><b>Fibruline xl assure :</b> inuline avec 99 % de fibres diététiques, analogue de matière grasse 1 kcal/g.</p> <p><a href="http://www.foodprocessing-technology.com">http://www.foodprocessing-technology.com</a></p>

Le FRUCTAGAVE PR 95 d'Agaviótica dont la composition est rapportée dans le Tableau 6 est un aliment fonctionnel, 100 % naturel, utilisé comme ingrédient pour donner une texture et du corps aux aliments et aux boissons. Ce produit contient des fructanes ramifiés obtenus à partir du jus d'Agave *tequilana* au moyen d'un processus physique et/ou biologique d'extraction et de purification. Après déshydratation on obtient une poudre blanche, de goût neutre et légèrement doucâtre. En raison de l'explosion du marché des prébiotiques et afin de satisfaire la demande mondiale de ces produits, il convient de trouver

de nouvelles sources de fructanes, comme par exemple les coeurs d'autres variétés d'agaves dont les A. pulquéro. Mais il convient aussi d'améliorer et d'optimiser les méthodes d'extraction et de purification des fructanes.

**Tableau 6 : Composition du produit commercial FRUCTAGAVE PR 95 d'Agaviótica (<http://www.agaviotica.com/es/pr95.html>).**

Propriétés physico- chimiques	Valeurs	Micro-éléments, éléments toxiques et microbiologie	Valeurs
pH (10% Sol. dans l'eau)	6.0 - 7.0	Cuivre, ppm,	$\leq 1$ ppm
Humidité	20 - 30 secondes	Fer, ppm	$\leq 30$ ppm
Dissolution dans l'eau	Bonne (avec agitation)	Sodium, ppm,	$\leq 10$ ppm
Apparence	Poudre blanche	Calcium, ppm,	$\leq 1$ ppm
Goût	Légèrement sucré	Potassium, ppm,	$\leq 20$ ppm
Dimension de particule	100 % maille #100	Magnésium, ppm,	$\leq 10$ ppm
Matière sèche	96.0%	Plomb	ND
Cendres	0.13%	Cadmium	ND
Sucres totaux	95.9%	Mercure	ND s
FOS/Fructanes	92.5%	Chrome	ND
D-Fructose	2.0%	Arsenic	0.1
D-Glucose	1.4%	Micro-organismes aérobiques	$< 200$ CFU.g <sup>-1</sup>
Lipide	Aucun	Levure et moisissure	$< 10$ CFU.g <sup>-1</sup>
Cholestérol	Aucun	<i>Bacilles cereus</i>	$< 10$ CFU.g <sup>-1</sup>
Calories	$< 1.5$ Kcal.g <sup>-1</sup>	coliformes totaux	absent dans 1g
DP moyen estimé	14-16 unités	<i>Staphylocoque doré</i>	absent dans 1g
		<i>Salmonelle</i>	absent dans 25g

## F. PRODUCTION INDUSTRIELLE DE FRUCTANES

A l'issue d'un procédé d'extraction des fructanes à partir d'une matière première végétale, on se trouve généralement en présence d'un mélange présentant une dispersité plus ou moins importante de la taille de molécules. Or, comme on l'a vu précédemment, les fructanes ont des potentialités différentes en fonction de leur DP. En effet, si les inulines de faible DP présentent des propriétés de digestibilité, une activité prébiotique, un pouvoir adoucissant, une capacité de rétention de l'eau et sont potentiellement moins caloriques, (Flickinger *et al.* 2003), seuls les oligosaccharides de faible DP (principalement DP 3–4) présentent des activités biologiques d'intérêts fonctionnels à condition qu'ils présentent un

haut degré de pureté (Kilian *et al.* 2000; Kaplan et Hutkins 2003; Kritzinger *et al.* 2003; Mellal *et al.* 2008). Cela implique alors la mise en œuvre de procédés de purification complexes et très coûteux. Les principaux procédés utilisés pour l'extraction et la purification des fructanes à l'échelle industrielle sont présentés brièvement ci-après.

## 1. Extraction

Si les processus techniques pour l'extraction et la concentration de l'inuline ne sont encore ni très bien décrits ni clairement compris (Paseephol *et al.* 2007), quelques travaux indiquent qu'au niveau industriel, les fructanes sont extraits mécaniquement de la racine de chicorée principalement. Le procédé d'extraction de l'inuline de cette racine est semblable à celui utilisé dans l'industrie sucrière. La racine de chicorée est d'abord découpée et lavée. Ensuite, l'inuline est extraite de la racine par diffusion dans l'eau chaude (70-80°C) lors de la macération des racines. Le chauffage du broyat est essentiel car il permet d'inactiver les enzymes de type inulinases. L'extrait brut obtenu est pasteurisé (91-93°C/15 min) et ensuite filtré. Cet extrait contient un mélange complexe de fructanes ainsi que des résidus de fructose, glucose et saccharose, des sels, des lipides, des protéines et des acides aminés. Les protéines et autres composants polaires sont alors éliminés par traitement avec de l'hydroxyde de calcium, du charbon actif et/ou des terres de diatomées, puis les glucides sont désionisés par passage sur des résines d'échange d'ions. (Paseephol *et al.* 2007).

## 2. Purification et fractionnement des fructanes

### a. Purification des FOS de faible DP

On ne retrouve que très peu de références consacrées à la purification des FOS, la plupart des études étant consacrées à la production des FOS par voie enzymatique ou biologique sans qu'il soit mentionné de voie de purification à l'échelle industrielle (Jung *et al.* 1993; Muramatsu *et al.* 1994; Yun *et al.* 1994; Ueno et Shinohara 1995; Sheu *et al.* 2002; Mysore *et al.* 2005)). On peut citer toutefois, les travaux de Sims *et al.* (1991) qui concernent la purification de FOS à l'échelle du laboratoire à partir de mélanges complexes en couplant 2 étapes de chromatographie : une chromatographie de perméation de gel assurant une séparation sur la base de la taille permettant l'élimination des composés de haut poids moléculaire, et une chromatographie en phase inverse permettant le fractionnement des FOS

proprement dit (Sims *et al.* 1991). Finke *et al.* (2002), utilisent également la chromatographie de perméation de gel pour le fractionnement des fructanes et la récupération de FOS mais afin de rendre le procédé attractif à l'échelle industrielle, celui-ci est mis en œuvre dans un chromatographe annulaire continu (Finke *et al.* 2002). Enfin on trouve également des travaux faisant mention de la mise en œuvre de la chromatographie HILIC (Hydrophilic Interaction Chromatography) mettant en œuvre une phase stationnaire hydrophile et une phase mobile hydrophobe (Lin et Lee 1998) ou encore la chromatographie ionique (Antošová *et al.* 1999 Wang *et al.* 2007) mais ces méthodes restent à l'échelle du laboratoire. À l'issue de cette étude, il semble que les techniques de séparation sur membranes soient encore une des voies les plus prometteuses pour la purification des FOS. Ces techniques seront décrites en section III.E.

b. Purification des fructanes de haut DP (inulines)

La fraction d'inuline de haut DP est généralement isolée par précipitation à l'éthanol, (Paseephol *et al.* 2007) ou par un mélange de solvants (méthanol, éthanol et acétone) (Fairweather. 1954; Smits *et al.* 2001; Moerman *et al.* 2004). L'utilisation de cette méthode à l'échelle industrielle pose néanmoins un certain nombre de problèmes. La manipulation de solvants organiques n'est pas sans danger pour les manipulateurs et pose des problèmes environnementaux. De plus, les rendements de récupération des fructanes de haut DP sont relativement faibles (Kunz *et al.* 1995; Moerman *et al.* 2004).

Il est également envisageable de récupérer des fructanes de haut DP par cristallisation suite à l'abaissement de la température. En effet, la solubilité des polymères glucidiques en solution aqueuse diminue lorsque la température décroît, les fructanes de haut DP vont donc être précipités à une température bien spécifique. Cette méthode réalisable à l'échelle du laboratoire n'est pas rentable économiquement au niveau industriel (Silver et Brinks 2000; Moerman *et al.* 2004).

Face aux limitations des procédés de purification classiques, les techniques de filtration sur membranes pourraient, là encore, être une alternative intéressante. Ces techniques permettent en effet le fractionnement de composés sur la base de leur taille. D'ailleurs, des premiers travaux ont montré que l'ultrafiltration de solutions de fructanes permet d'obtenir des fractions d'inuline avec un haut degré de polymérisation (DP).

Toutefois, en raison de problèmes de colmatage mal maîtrisés, l'efficacité du procédé n'est pas encore à la hauteur des espérances (Berghofer *et al.* 1993; Lorenzo *et al.* 1999; Moerman *et al.* 2004). En effet, l'optimisation du processus de filtration par les techniques à membranes est délicate en raison de l'encrassement interne et externe de celles-ci qui mène à une détérioration rapide du fonctionnement des membranes.

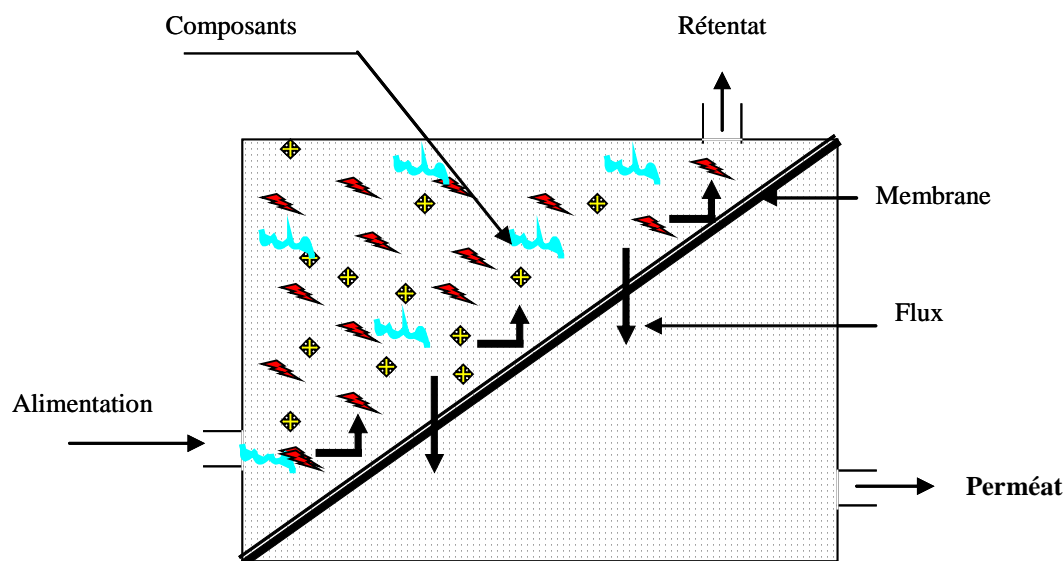
Les recherches doivent donc être poursuivies dans ce domaine mais l'intégration de techniques membranaires au sein d'un procédé de purification ne peut être réussie sans un minimum de connaissances de ces techniques et vont être présentées dans la partie suivante.

### **III. GENERALITES SUR LES TECHNIQUES MEMBRANAIRES**

Les techniques de séparation membranaire constituent un ensemble de procédés de séparation en pleine expansion en raison de l'étendue des secteurs d'application. Permettant à la fois le traitement des gaz mais aussi des liquides, on retrouve ces procédés dans le traitement de l'eau, les industries chimiques, les industries alimentaires et pharmaceutiques, dans des applications en biotechnologie et dans le secteur médical (dialyse rénale). Outre leurs capacités de séparation liées aux caractéristiques de la membrane utilisée et qui permettent des séparations allant des particules (i.e. micro-organismes) aux ions en passant par les macromolécules et les molécules de taille plus faible, ces procédés sont caractérisés par une faible consommation énergétique (fonctionnement à température ambiante et sans changement de phase), un faible impact sur l'environnement (procédés ne nécessitant pas l'utilisation de solvant ou d'adjuvant) et une conception modulaire permettant l'adaptation des installations aux quantités à traiter. A ce jour, seule une partie des techniques membranaires a atteint un succès commercial (Microfiltration (MF), Ultrafiltration (UF), Osmose Inverse (OI), Electrodialyse (ED)) tandis que d'autres très prometteuses sont encore en développement (Nanofiltration (NF), Pervaporation, Distillation et Evaporation Membranaire (DM et EM)).

#### **A. DEFINITION ET CLASSIFICATION DES TECHNIQUES MEMBRANAIRES**

Une membrane est une barrière sélective qui sous l'effet d'une force de transfert, permet la séparation d'une solution d'alimentation en deux effluents : le perméat qui se compose du solvant et des composants capables de traverser la membrane (phase diluée) et le rétentat qui contient les composants retenus par la membrane (phase concentrée) (Figure 8). La structure des membranes peut être symétrique (diamètre de pores constant sur toute l'épaisseur de la membrane) ou asymétrique (diamètre de pores croissant d'une face à l'autre de la membrane). Les membranes composites sont apparues plus récemment et sont constituées d'une très fine couche de surface (de l'ordre de 0,01-0,1 $\mu$ m) déposée sur une structure plus épaisse (support macroporeux) (Cheryan 1998).



**Figure 8 : Représentation schématique du procédé de filtration sur membrane.**

Selon le type de membranes (membranes poreuses ou denses, membranes chargées ou non) et la nature de la force motrice mis en œuvre (gradient de pression, de concentration, de potentiel électrique...), on obtient tout un panel de procédés différents dont les caractéristiques et les applications sont reportées dans le Tableau 7.

En raison des objectifs de ce travail de thèse, nous nous limiterons pour la suite de cette revue bibliographique au cas des procédés baromembranaires. Il s'agit de procédés utilisant tous un gradient de pression comme force motrice et se différenciant par la taille des espèces séparées. Ces procédés sont très utilisés dans le domaine médical, pharmaceutique ou encore agroalimentaire pour le fractionnement, la purification, la concentration ou la clarification de solutions biologiques (Van Reis et Zydney 2007).

La microfiltration suscite un intérêt particulier dans le secteur de l'industrie agroalimentaire en raison de ces capacités à retenir les micro-organismes. Elle permet ainsi la pasteurisation à froid de jus de fruits, de lait et autres boissons préservant ainsi au mieux leurs caractéristiques sensorielles et nutritionnelles.

**Tableau 7 : Caractéristiques et principales applications des techniques membranaires les plus utilisées (Zeman et Zydney 1996; Cheryan 1998).**

<b>Techniques membranaires</b>	<b>Force motrice</b>	<b>Type de membranes</b>	<b>Mécanismes de séparation de membrane</b>	<b>Principales applications</b>
<b>Microfiltration (MF)</b>	$\Delta$ pression 0,5-1 bar.	Membranes poreuses asymétriques 0.1 à 10 $\mu\text{m}$	Effet tamis PM $\geq$ 100 kDa	Clarification Filtration stérile concentration de solutions de particules...
<b>Ultrafiltration (UF)</b>	$\Delta$ pression 1 -10 bar.	Membranes poreuses asymétriques 0,005 à 0,1 $\mu\text{m}$	Effet tamis PM 10 - 100 kDa	Concentration, fractionnement et purification de molécules...
<b>Nanofiltration (NF)</b>	$\Delta$ pression 10-30 bar.	Membranes poreuses asymétriques ou composites 0,001 à 0,01 $\mu\text{m}$	Effet tamis PM 0,2 – 20 kDa	Séparation des sucres, petites molécules, sels divalents et acides dissociés...
<b>Osmose inverse (OI)</b>	$\Delta$ pression 35-100 bar.	Membranes denses asymétriques 0,0001 à 0,001 $\mu\text{m}$	Solubilité et diffusion PM 0,02 - 0.2 kDa	Dessalage de l'eau de mer, concentration de microsolutés
<b>Dialyse (DI)</b>	$\Delta$ concentration	Membranes symétriques denses	Diffusion	Séparation des composantes de faibles poids moléculaires
<b>Electrodialyse (ED)</b>	$\Delta$ électrique	Membranes échangeuses d'ions	Migration en fonction de la charge des espèces	Stabilisation tartrique du vin, désacidification des jus de fruits, déminéralisation,...
<b>Séparation de gaz (SG)</b>	$\Delta$ pression	Membranes denses asymétriques	Solubilité et diffusion	Séparation de gaz et vapeurs
<b>Pervaporation (PV)</b>	$\Delta$ potentiel chimique	Membranes denses asymétriques	Solubilité et diffusion puis désorption avec changement de phase	Déshydratation de solvant, élimination de composés organiques (i.e. arômes), purification de mélanges azéotropiques
<b>Distillation membranaire</b>	$\Delta$ pression partielle	Membranes poreuses hydrophobes	Vaporisation, diffusion en phase gaz puis condensation	Production d'eau pure, concentration de solution

L'ultrafiltration est la technique membranaire la plus ancienne et la plus répandue, en raison du vaste domaine de séparation qu'elle concerne. Il est en effet possible de purifier, fractionner ou concentrer des molécules dont la taille varie de 1000 à plusieurs centaines de kDa. Parmi les molécules susceptibles d'être séparées, on retrouve notamment les protéines, les polysaccharides et d'autres molécules biologiques.



Enfin, la nanofiltration, dernière née des procédés baromembranaires, concerne la séparation de molécules dont la taille est comprise entre 200 et 1000 Da. Plus précisément, la nanofiltration permet la séparation du solvant des sels monovalents et des composés organiques de faible masse de mélanges plus complexes (Van Reis et Zydney 2007).

Ainsi en couplant ces différentes techniques, il est possible de fractionner sur la base de leur taille l'intégralité des constituants d'une solution biologique comme on peut le voir sur l'exemple représenté sur la Figure 9.

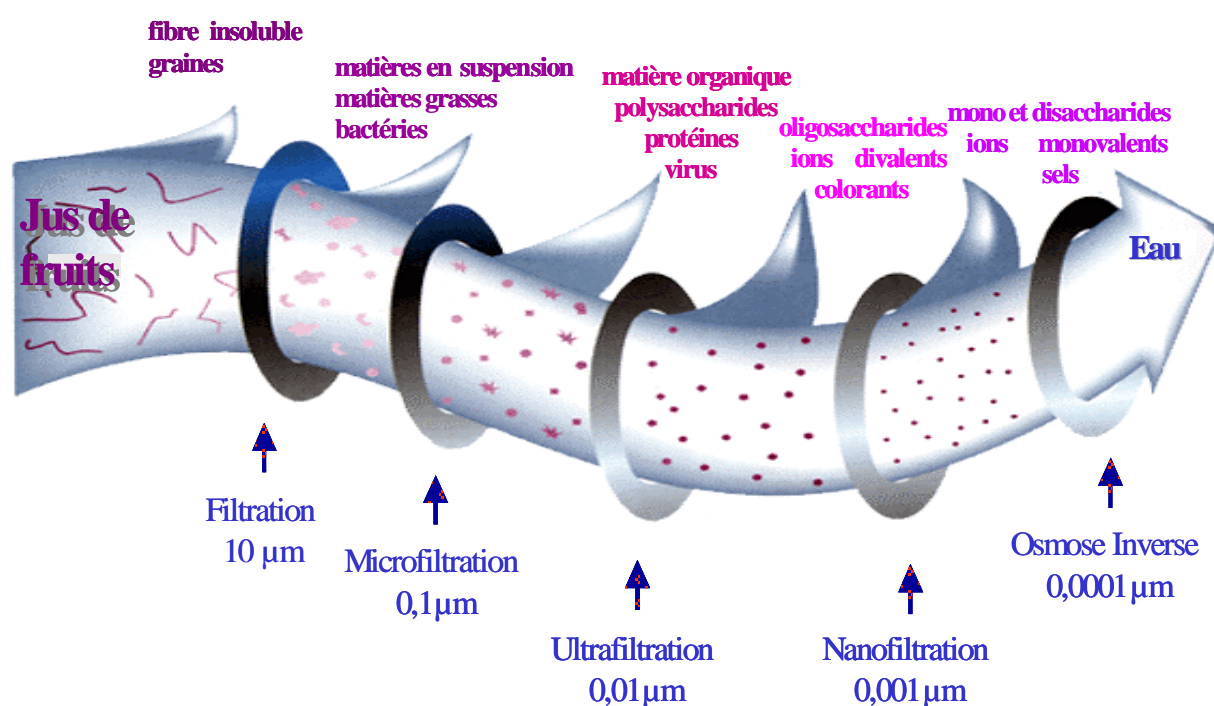


Figure 9 : Exemple de couplage des techniques baromembranaires pour la séparation des composants de jus de fruits. (d'après TIA.fr).

## B. MEMBRANES ET MODULES MEMBRANAIRES

### 1. Nature chimique des membranes

La nature des matériaux qui constituent la membrane joue un rôle fondamental. Selon la nature des matériaux qui sont généralement utilisés pour leur fabrication, les membranes sont classées en 3 catégories.

a. Membranes organiques

Elles sont fabriquées par inversion de phase à partir de différents types de polymères. Selon la nature du polymère utilisé pour leur fabrication, ces membranes présentent un certain nombre d'avantages et d'inconvénients qui sont listés dans le Tableau 8

Tableau 8 : Principaux avantages et inconvénients des membranes organiques.

<b>Matériau organique</b>	<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
<b>Cellulose</b>	Peu d'adsorption des protéines, flux importants, coût faible	Sensible à la température, à la pression, aux microorganismes et au chlore
<b>Polyamide</b>	Bonne stabilité aux solvants	Gamme de pH limitée
<b>Polysulfone</b>	Bonne tenue au pH et bonne stabilité thermique et mécanique	Sensible à la pression, forte adsorption des protéines
<b>Acryliques</b>	Résistance à la pression et aux oxydants	Seuils de coupure élevés
<b>Fluorés</b>	Résistance thermique et chimique	Faible perméabilité et gamme de seuils de coupure limitée

Ce tableau n'est pas exhaustif en raison des récents progrès que les fabricants de membranes organiques ont pu faire. En effet, il est possible d'améliorer les performances d'une membrane grâce à des modifications physico-chimiques (ajout d'une molécule dans le polymère lors de l'étape de synthèse ou greffage ultérieur) (Kaeselev *et al.* 2001; Marchese *et al.* 2002). Ainsi, les membranes produites à partir d'un même polymère peuvent avoir des propriétés très différentes d'un fournisseur à un autre.

Les modifications ont principalement pour but de changer l'hydrophobicité de la membrane afin de limiter les phénomènes d'adsorption. Ceci présente un grand intérêt pour les applications en agroalimentaire, les molécules biologiques ayant tendance à s'adsorber plus facilement sur les matériaux hydrophobes.

Concernant la faible résistance à la température généralement reprochée aux membranes polymériques, il existe maintenant des membranes à base de polyétherimides, de

polysulfones ou de polyvinylidène fluoride pouvant être stérilisées à la vapeur (Wang *et al.* 2001).

La cellulose a également été modifiée afin d'améliorer les résistances des membranes obtenues. Ainsi des membranes préparées à base de cellulose régénérée sont capables de résister à des températures allant jusqu'à 70 °C, à une gamme de pH de 2 à 13 et à une pression transmembranaire de 5,5 bar. De plus, grâce à leur faible capacité d'adsorption des protéines, elles conduisent à des flux de perméat plus stables que les membranes en polyéthersulfones (PES) lors de la filtration de solutions biologiques (Vazquez et Benavente 2003; Kallioinen *et al.* 2006; Zularisam *et al.* 2006).

#### b. Membranes inorganiques

Elles sont fabriquées par frittage à partir d'oxydes métalliques ou de silice. Il existe également des membranes métalliques. Leur principal avantage est de pouvoir être utilisées dans des conditions extrêmes de température, de pression et d'agression chimique. Les membranes inorganiques sont généralement composites : sur un support d'alumine ou de carbone, une fine couche active à base d'oxydes métalliques (oxyde de zircon (ZrO<sub>2</sub>), de titane (TiO<sub>2</sub>)...) est déposée.

#### c. Membranes hybrides

Entre ces deux catégories de matériaux, des membranes hybrides constituées d'une couche de polymères déposée sur un support minéral sont en développement pour des applications ciblées comme les synthèses enzymatiques en conditions extrêmes, (Belleville *et al.* 2001; Rios *et al.* 2007; Kochkodan *et al.* 2008).

## 2. Seuil de coupure et diamètre des pores

Dans le cas des membranes poreuses inorganiques, la sélectivité des membranes est fonction du diamètre moyen de leurs pores. Dans le cas des membranes denses et plus généralement des membranes organiques pour lesquelles il n'est pas possible de définir une taille de pores précise, la capacité de séparation des membranes est définie par la notion de seuil de coupure (encore appelé en anglais molecular weight cut off (MWCO) et exprimé en Dalton (Da). Le seuil de coupure correspond à la masse moléculaire des molécules dont le

taux de rétention est supérieur à 90%. La notion de seuil de coupure est une notion purement expérimentale, elle est relative à un composé et s'obtient par une caractérisation dynamique, c'est à dire par filtration de solutés traceurs (en général des protéines ou des polymères tels que les polyéthylèneglycol (PEG) ou les dextrans) calibrés de différents poids moléculaires dont on mesure le taux de rétention dans des conditions données (Cheryan 1998).

### 3. Configurations membranaires

Les caractéristiques des modules membranaires dépendent de deux géométries membranaires basiques : à savoir la géométrie plane et la géométrie tubulaire (Guizard, 1995a; Zeman et Zydney, 1996; Cheryan, 1998; Wakeman et Tarleton, 1999)

Les membranes planes permettent le montage de 2 configurations de module différentes à savoir :

#### Modules plans

où les membranes sont empilées en mille-feuilles séparées par des cadres intermédiaires qui assurent la circulation des fluides.

#### Modules spiralés

où une membrane plane est enroulée sur elle-même autour d'un tube poreux destiné à recueillir le filtrat. On obtient ainsi un cylindre multicouches où le perméat s'écoule selon un chemin spiralé vers le tube poreux tandis que l'alimentation circule dans l'axe du tube dans les espaces prévus à cet effet. Ces modules sont très compacts mais la faible épaisseur de la veine liquide entraîne des risques de colmatage élevés et rend le nettoyage difficile.

Lors de la mise en œuvre de modules tubulaires, la configuration de ces derniers dépend du diamètre des membranes utilisées. Ainsi on retrouve :

#### Modules tubulaires

constitués de membranes tubulaires mono-canal ( $\varnothing \geq 10$  mm) ou de membranes multi-canaux ( $\varnothing 0.5$  à 10 mm). Basés sur une technologie simple, leur mise en œuvre et les conditions de nettoyage sont aisées mais ils sont grands consommateurs d'énergie et présentent une très faible surface d'échange par unité de volume (module peu compact).

Modules fibres creuses

constitués par l'assemblage d'un grand nombre de petits capillaires (fibres) dont le diamètre intérieur varie de 0,1 à 0,5 mm, la couche active pouvant être située à l'intérieur ou à l'extérieur de la fibre. Ces modules sont très compacts mais sensibles au colmatage.

Lors du choix d'un type de module de filtration tangentielle, le coût associé au pompage de l'alimentation et à la recirculation le long de la membrane doit être pris en compte (Zeman et Zydney, 1996). Ainsi d'après le Tableau 9 où sont comparées les caractéristiques des différentes configurations membranaires, on constate que les modules fibres creuses sont très compacts et d'un coût de fonctionnement limité. Cependant, leur principal inconvénient est lié aux risques élevés de colmatage des membranes.

**Tableau 9 : Comparaison des caractéristiques et des paramètres opératoires des différentes configurations de modules commerciaux (Zeman et Zydney, 1996).**

Configuration des modules	Ø (mm)	Compacité ( $\text{m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$ )	Coût énergétique (pompe)	Colmatage	Facilité de nettoyage
Fibres creuses	0,025-0,8	1200	Faible	Élevé	Moyenne
Tubulaire	0,5 – 25	60	Élevé	Faible	Excellente
Plan	-	300	Moyen	Moyen	Bonne
Spirale	-	600	Faible	Très élevé	difficile à moyenne

### C. MODES DE FILTRATION

En fonction du type de membrane et/ou du module utilisé, la filtration peut être conduite selon deux modes : le mode frontal ou le mode tangentiel.

#### 1. Filtration frontale

Tout comme en filtration classique, la solution d'alimentation s'écoule perpendiculairement à la membrane grâce à l'application d'un gradient de pression. Le solvant et les solutés de faible masse traversent la membrane alors que les solutés retenus s'accumulent à la surface de cette dernière créant ainsi un dépôt qui croît au fur et à mesure de

la filtration sans jamais se stabiliser. La croissance de ce dépôt va entraîner une diminution permanente de la densité de flux de perméat. Il est à noter que ce type de filtration est souvent utilisé à l'échelle du laboratoire ou lors des premiers essais dans le cadre d'une étude visant l'intégration d'une technique membranaire au sein d'un procédé de séparation. Ce type de filtration peut également être mis en œuvre pour la filtration de solutions faiblement chargées et/ou contenant des composés à forte valeur ajoutée du fait de l'absence de volume mort.

## **2. Filtration tangentielle**

La solution d'alimentation circule parallèlement à la surface filtrante. Cette circulation permet de réduire les dépôts de surface et d'obtenir ainsi des débits de perméat plus importants qu'en filtration frontale. De plus, la filtration tangentielle permet de travailler en continu, ce qui est un gain de rendement non négligeable pour un procédé industriel. Dans un système de filtration tangentielle, l'opération peut être conduite en mode fermé ou continu, comme on va le voir ci-après.

### **a. Mode fermé (Batch)**

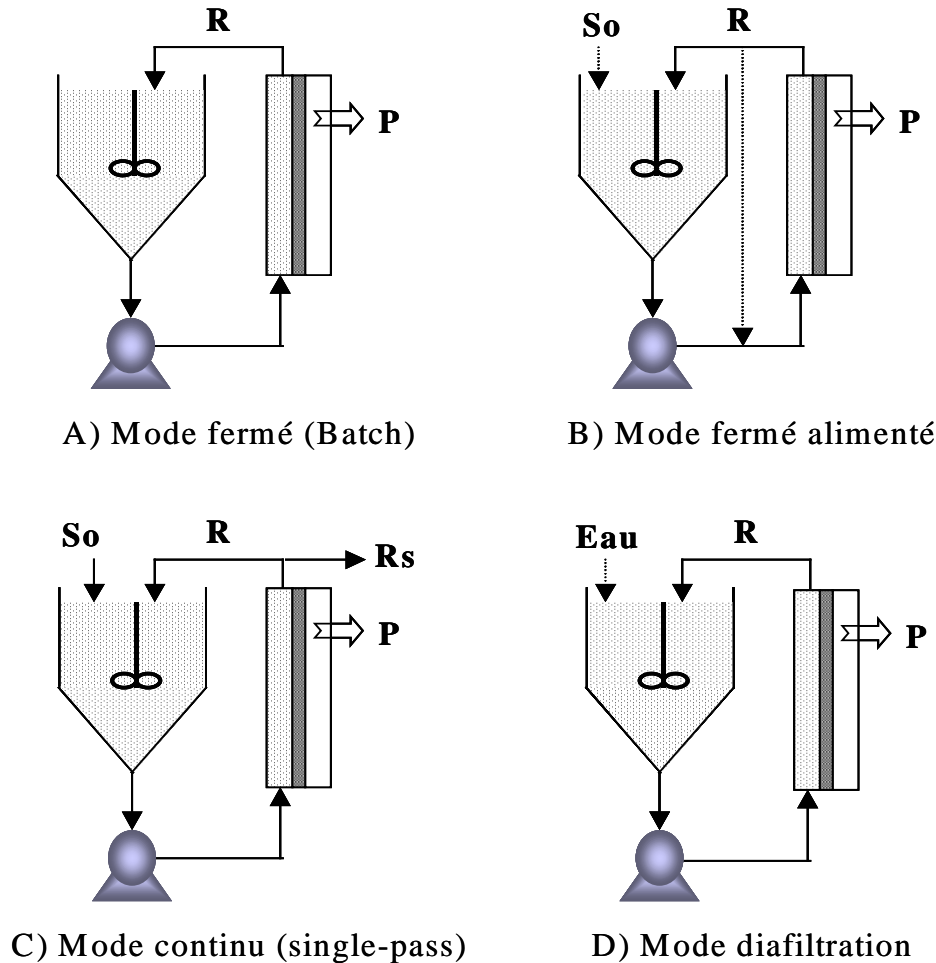
La totalité de la solution à filtrer est introduite dans le bac d'alimentation. La filtration est réalisée en recyclage total du rétentat. Ce mode est généralement utilisé lors d'essais réalisés à l'échelle du laboratoire. Le suivi de débit de filtration en fonction d'un facteur de réduction volumique (FRV) dans un procédé batch, permet de fixer la concentration maximale de travail utilisable au niveau industriel (Figure 10A).

### **b. Mode fermé alimenté**

Afin de limiter les dégradations liées à la recirculation du rétentat lors d'un fonctionnement en mode fermé, le volume de solution mis à recirculer est limité et la solution à filtrer est apportée en continu en fonction du débit de perméat obtenu. On procède généralement ainsi lorsque le produit d'intérêt se retrouve dans le perméat (ex : clarification de jus de fruits) (Figure 10B). Par contre ce fonctionnement est à éviter si le produit d'intérêt se trouve être dans le rétentat, ceci en raison d'une exposition trop longue aux contraintes de cisaillement induites par la recirculation (Cheryan 1998).

c. Mode continu

Le système est alimenté en continu avec la solution à traiter de façon à maintenir le volume de rétentat constant, et ce quel que soit le taux de recyclage du rétentat imposé. C'est généralement le mode de fonctionnement utilisé à l'échelle industrielle (Figure 10C) (Cheryan 1998; Darnon 2001; Li *et al.* 2004).



**Figure 10 :** Différents modes opératoires en filtration tangentielle. So= alimentation ; R= rétentat en circulation ; Rs= Sortie de rétentat P= perméat.

d. Diafiltration

La diafiltration est en réalité une filtration avec dilution, c'est-à-dire avec ajout continu ou discontinu de solvant pur dans l'alimentation, (Figure 10D). Différentes applications de la diafiltration ont été reportées (Lipnizki *et al.* 2002; Wang *et al.* 2002; Li *et al.* 2004; Yazdanshenas *et al.* 2005). Un des avantages est de pouvoir conserver une densité

de flux de perméat élevée en cours de filtration. Mais l'avantage le plus recherché est la possibilité d'atteindre de meilleurs niveaux de fractionnement, la solution traitée peut ainsi être « lavée » jusqu'à épuisement total de l'un de ses solutés. Malgré cela, la mise en œuvre de procédés de diafiltration implique des surfaces et des durées de filtration élevées. Les effluents obtenus sont extrêmement dilués, ce qui nécessite des étapes importantes de concentration en sortie.

Quel que soit le mode de filtration retenu (filtration frontale ou tangentielle), la filtration peut avoir lieu à pression constante ou à débit constant. La première option est plus simple à mettre en œuvre sur des installations à petite échelle, elle est par conséquent la plus utilisée en laboratoire et à l'échelle pilote. Elle est utilisée lors d'opérations pour lesquelles la variation du débit de perméat au cours du temps ne pose pas de problème. La seconde option impose un système de régulation plus lourd. Cette option est surtout utilisée à l'échelle industrielle pour les procédés de filtration en continu, car elle permet de contrôler la productivité.

#### **D. CRITERES D'EVALUATION DES PERFORMANCES LORS DE LA FILTRATION TANGENTIELLE DE SOLUTIONS BIOLOGIQUES.**

Dans toutes les solutions biologiques se trouvent de nombreuses catégories de molécules avec des concentrations et des propriétés qui leur sont propres. Ces molécules sont capables d'interagir entre elles mais également avec tous les matériaux susceptibles d'entrer en contact avec elles, par des liaisons de plus ou moins faible énergie. Ceci a pour effet de multiplier le nombre des phénomènes qui se mettent en place lors d'une filtration. De ce fait, il n'existe dans la littérature que peu de liens entre les modèles théoriques établis sur des solutions simple, (Marshall *et al.* 1993; Nataraj *et al.* 2008) et les performances obtenues avec des solutions réelles comme le vin (Belleville *et al.* 1990; Gergely *et al.* 2003; Siva 2007), le lait (Engel *et al.* 2002; James *et al.* 2003; Akoum *et al.* 2006) et les jus de fruits principalement (Balakrishnan *et al.* 2000; Zwijnenberg *et al.* 2002; Yazdanshenas *et al.* 2005; Saha *et al.* 2007). Donc il est bien difficile de prévoir les conditions et performances des opérations de filtration pour une solution particulière, comme par exemple le jus d'agave. C'est pour cette raison que dans la plupart des cas, pour appréhender le comportement d'une solution, il est plus aisé de se référer à des études empiriques basées sur des critères globaux de comparaison à savoir : le flux de perméation et le taux de rétention.



## 1. Flux de perméat d'un solvant pur

Quand on filtre un solvant pur tel que l'eau, la densité de flux de perméat est proportionnelle à la force motrice et peut s'écrire selon l'Eq. 1,1 d'après la loi de Darcy :

$$J_p = \frac{\Delta P}{\mu R_m} \text{ ou encore } J_p = L_p \Delta P \quad \text{Eq. 1,1}$$

Où :

- $\Delta P$  : pression transmembranaire (bar)
- $L_p$  : perméabilité du solvant ( $\text{m.s}^{-1}.\text{bar}^{-1}$ )
- $\mu$  : viscosité dynamique du solvant ( $\text{bar.s}$ )
- $R_m$  : résistance intrinsèque de la membrane ( $\text{m}^{-1}$ ).

## 2. Flux de perméat d'une solution biologique

Lorsque l'on filtre une solution biologique, la densité de flux de perméat atteint une valeur limite quand la pression augmente. La loi de Darcy (Eq. 1,1) ne s'applique donc plus. A l'origine de ce phénomène on retrouve les phénomènes de la polarisation de concentration et le colmatage (Cheryan 1998).

### a. Polarisation

La polarisation de concentration est liée à l'accumulation des molécules au voisinage de la membrane conduisant ainsi à la mise en place d'une nouvelle résistance au transfert de matière. En effet, lors de la mise en œuvre de la filtration, les solutés présents dans la veine liquide vont s'accumuler à la surface de la membrane sous l'effet du flux convectif. Les grosses particules vont être arrêtées par la barrière constituée par la membrane. Un profil de concentration va alors se créer aux abords de la membrane et va générer en retour, un flux diffusionnel des solutés de la membrane vers la veine liquide. En régime permanent, ces deux flux contraires vont aboutir en se stabilisant, à la formation d'une couche présentant un fort gradient de concentration appelée couche de polarisation comme on peut le voir sur la Figure 11.

La polarisation est un phénomène réversible qui dépend des conditions opératoires en particulier de l'hydrodynamique du système. Ainsi, l'augmentation de la vitesse tangentielle,

en réduisant l'épaisseur de la couche limite laminaire permet de réduire l'importance de la polarisation. Par contre, l'augmentation de la pression transmembranaire entraîne une augmentation de ces phénomènes, l'accumulation des solutés retenus est accrue suite à l'augmentation du flux convectif de solvant vers la membrane.

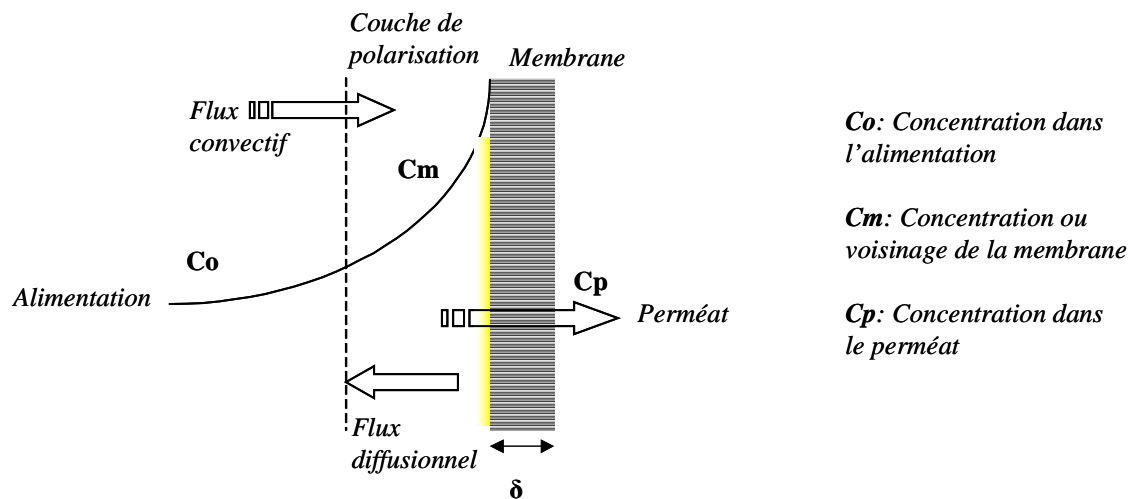


Figure 11 : Profil de concentration dans la couche limite.

L'importance de la polarisation dépend de la membrane et en particulier de la perméabilité au solvant de cette dernière. Plus cette perméabilité est grande, plus la polarisation est importante, c'est pourquoi les phénomènes de polarisation sont plus importants pour les opérations de microfiltration par rapport aux opérations d'ultrafiltration.

Enfin la composition de la solution joue aussi un rôle sur la polarisation. Plus une solution est concentrée, plus cette dernière aura une viscosité importante ce qui entraînera une augmentation des phénomènes de polarisation. La nature des espèces a également une influence dans le sens où une valeur élevée du coefficient de diffusion facilitera le retour des composés accumulés à la surface de la membrane vers le cœur de la solution. En jouant sur la température, il est possible de réduire la viscosité de la solution d'une part et d'augmenter les coefficients de diffusion des espèces d'autre part.

Il est important de contrôler la mise en place de la polarisation car cette couche limite est une réelle résistance au transfert. En effet, l'accumulation de solutés crée une pression osmotique au voisinage de la membrane, la pression transmembranaire effective est donc

abaissée tout comme le flux de perméat, (Mi et Hwang 1999). De plus, la polarisation est à l'origine des phénomènes de colmatage comme nous allons le voir ci-après.

b. Colmatage

Le colmatage résulte de tous les phénomènes prenant place à l'interface entre le milieu liquide et la membrane, c'est-à-dire de l'intensification des phénomènes d'adsorption et de la formation de dépôts suite à la précipitation ou à la gélification de certaines molécules. Lorsque la taille des solutés est très inférieure à celle des pores, l'adsorption et une partie du dépôt peut se situer dans les pores : (réduction du diamètre de pores suite à l'adsorption des espèces filtrées ou suite au blocage total par encombrement stérique) on parle alors de colmatage interne. Il en résulte une baisse du flux de perméat qui peut tendre alors vers zéro.

Quand les solutés retenus s'accumulent à la surface de la membrane pour créer un dépôt, on parle alors de colmatage externe. Ce dépôt, encore appelé membrane dynamique, peut être moins perméable et plus sélectif que la membrane elle-même.

L'intensité du colmatage va dépendre de la nature de la membrane et de la solution filtrée. En effet les interactions entre les solutés et la membrane vont dépendre des propriétés de surface du matériau membranaire et en particulier de son caractère hydrophile (cas des membranes à base de cellulose ou de polyamides aliphatiques) ou hydrophobe (cas des membranes à base de polyethersulfone, de polyéthylène, ou de polypropylène) (Boussu *et al.* 2007).

La nature des espèces chimiques présentes dans la solution à filtrer est importante. Dans le cas des solutions biologiques, parmi les espèces chimiques les plus susceptibles d'induire des problèmes de colmatage, on retrouve les protéines du fait de leur aptitude à interagir avec des groupements hydrophobes. Les phénomènes d'adsorption à l'origine de colmatages sont plus intenses lors de la filtration sur les membranes les plus hydrophobes (Weis *et al.* 2005; Gabino *et al.* 2007; Katsoufidou *et al.* 2007). Ces interactions vont toutefois être influencées par les valeurs du pH et de la force ionique (Jones et O'melia 2000; Frank et Belfort 2003; Evans *et al.* 2008) ;

Les polysaccharides sont également à l'origine de phénomènes de colmatage en particulier lors de la filtration de solutions biologiques d'origine végétale. Ceci est dû à la présence de composants de différentes tailles et de leurs conformations moléculaires en solution (Saha *et al.* 2006; Nataraj *et al.* 2008). A ce jour, il existe de nombreuses publications consacrées à l'étude de leur influence (Vernhet *et al.* 1999; Susanto et Ulbricht 2005; Drews *et al.* 2006; Grelier *et al.* 2006; Saha *et al.* 2006; 2007; Susanto *et al.* 2007; Zularisam *et al.* 2007). Cependant, peu d'entre elles sont consacrées à l'étude du mécanisme de colmatage lui-même afin d'établir un modèle spécifique pour ce type de constituants (Saha *et al.* 2007; Nataraj *et al.* 2008).

Saha *et al.* (2006) ont montré que le mécanisme de colmatage des membranes lors de la filtration de solutions contenant un mélange de polysaccharides a lieu en deux étapes. Dans un premier temps, des polysaccharides se déposent dans le pore entraînant ainsi une réduction de son diamètre (mise en place d'un colmatage interne). Puis par la suite, les macromolécules rejetées par la membrane, s'accumulent alors à la surface de cette dernière sous forme d'une couche plus ou moins importante (mise en place d'un colmatage externe). En s'appuyant sur des expériences mettant en évidence une réduction du MWCO des membranes après filtration de polysaccharides, Saha *et al.* (2007) concluent que le blocage des pores se met en place dès les premières minutes de filtration et est associé à la baisse rapide du flux de perméation (Saha *et al.* 2006; 2007).

Ces conclusions ont été confirmées par Nataraj *et al.* (2008) qui, en plus, apportent des précisions sur l'influence de certains paramètres à savoir :

**la concentration en polysaccharides :** comme on peut s'y attendre, le colmatage augmente avec la concentration et le modèle du simple gâteau de filtration n'est plus valable lorsque la concentration est supérieure à 20 mg/l.

**la nature des polysaccharides présents :** les polysaccharides en solution forment généralement des micro agrégats dont la taille est influencée par les conditions de filtration mais aussi par le type des polysaccharides présents (composition chimique, structure...), les conditions de préparation de la solution, etc. L'impact sur le colmatage sera alors très différent (Nataraj *et al.* 2008).

### 3. Sélectivité du procédé de séparation

La sélectivité d'un procédé de filtration sur membrane est en relation avec le taux de rétention des différentes espèces moléculaires présentes dans la solution. Ce taux de rétention est estimé à partir de l'Eq. 1,2 (Cheryan 1998) :

$$R (\%) = \left[ \frac{C_F - C_P}{C_F} \right] \times 100 = \left[ 1 - \frac{C_P}{C_F} \right] \times 100 \quad \text{Eq. 1,2}$$

Où  $C_F$  est égale à la concentration en solutés dans la solution d'alimentation et  $C_P$ , à la concentration en solutés dans le perméat.

Un soluté peut être partiellement ou complètement retenu (ou rejeté) alors que le solvant passe librement. Quand un soluté est complètement rejeté par la membrane (c'est-à-dire lorsque  $R=100\%$ ), les données sont présentées en terme de Rapport de Concentration Volumique (RVC) :

$$RCV = V_O \cdot V_R^{-1} \quad \text{Eq. 1,3}$$

Où  $V_O$  est le volume d'alimentation initiale et  $V_R$  le volume de rétentat.

Enfin, il est également pratique, lors des opérations de concentration, de suivre l'évolution du flux en fonction du Facteur de Réduction Volumique **FRV**, défini par l'Eq.1,4 :

$$FRV = (V_O - V_R) \cdot V_O^{-1} \cdot 100 = V_P \cdot V_O^{-1} \cdot 100 \quad \text{Eq. 1,4}$$

## E. APPLICATION DES TECHNIQUES MEMBRANAIRES AU FRACTIONNEMENT DE SOLUTIONS DE FRUCTANES

Les fructanes, comme on l'a vu dans la section I.IIB, sont une grande famille de composés présentant des propriétés variées selon leur structure et leur taille, elles-mêmes dépendantes de leur degré de polymérisation (DP). En effet, les fructanes de DP supérieur à 12 sont intéressants de par leurs propriétés rhéologiques comme modificateur de texture et analogue de la matière grasse en plus de leur effet prébiotique alors que les fractions

contenant des fructanes de faible DP (DP 3-6) présentent de meilleures propriétés prébiotiques (Paseephol *et al.* 2007; Van De Wiele *et al.* 2007). Il peut donc s'avérer intéressant de disposer de techniques de séparation efficaces pour purifier ces différents types de fructanes à partir d'une source d'inuline donnée (Silver 2006).

Des techniques de fractionnement basées sur des effets de taille comme le sont les techniques baromembranaires présentent une alternative intéressante pour la production de fructanes de DP ciblés par rapport aux procédés classiques de précipitation fractionnée. Des premières études ont d'ailleurs montré l'intérêt potentiel du couplage UF/NF pour la clarification, la purification et la concentration des inulines et FOS à partir de différentes sources végétales.

En 1996, Nitsch a breveté un procédé membranaire visant la purification de fructanes destinés au diagnostic rénal à partir d'ail en poudre. Le procédé mis en place comprend 2 étapes. Dans un premier temps, la solution est clarifiée par filtration sur une membrane dont le seuil de coupure est compris entre 30 et 50 kDa (0,004 $\mu$ m) pour l'élimination des protéines et des autres constituants de grande taille. Puis le perméat est filtré en mode diafiltration sur une membrane de seuil de coupure compris entre 1 et 1,5 kDa en vue d'éliminer les sels, les mono et disaccharides (Nitsch 1996).

Un travail plus complet a été breveté par Lorenzo *et al.* (1999), ces auteurs ont proposé trois procédés différents pour la clarification et le fractionnement des inulines de tubercules de topinambour. Chacun de ces procédés combine 2 à 3 étapes de filtration successives en utilisant différentes membranes organiques de plus en plus sélectives. Pour améliorer la séparation, les filtrations sont conduites en alternant les cycles de concentration et de diafiltration (Lorenzo *et al.* 1999).

Kamada *et al.* (2002) ont utilisé une membrane de polysulfone (PS) de seuil de coupure égal à 20 kDa pour la clarification de fructanes de topinambour et ont évalué les performances de quatre différentes membranes de nanofiltration pour concentrer l'extrait clarifié.

Li *et al.* en 2004 ont comparé l'incidence de différents modes de diafiltration (en volume constant et volume variable) sur la purification de FOS par nanofiltration (membranes GH and GK Osmonic). Ils concluent que si la pureté et le rendement en FOS obtenus sont

indépendants du mode opératoire, la consommation d'eau et donc la rentabilité du procédé dépend du mode de filtration, (Li *et al.* 2004).

Enfin, il existe également des études consacrées à l'utilisation de membranes céramiques pour la clarification d'extraits d'inuline. Silver *et al.* (2003 et 2006) ont breveté un procédé mettant en oeuvre des membranes tubulaires minérales en alumine- $\alpha$  de 0,1  $\mu\text{m}$ , couplées à la centrifugation du rétentat afin de protéger la membrane des risques d'encrassement par des composés et/ou des bactéries (Silver 2003; 2006).

A l'issue de cette étude bibliographique, on constate qu'aucun travail n'a encore été consacré au fractionnement par technologie membranaire des fructanes issus des agaves et des jus d'agave. En raison des structures particulières des inulines d'agave encore appelées « agavines », il est peu probable que les résultats obtenus lors du fractionnement sur membrane des fructanes de topinambour ou de chicorée soient directement transposables et applicables aux agavines. C'est donc pour contribuer à l'amélioration des connaissances dans ce domaine et favoriser la valorisation de cette matière première que ce travail de thèse a été entrepris. La démarche retenue pour mener à bien cette étude est décrite dans la section suivante.

#### **IV. DEMARCHE POUR L'INTEGRATION DE LA TECHNOLOGIE MEMBRANAIRE DANS UN PROCEDE INDUSTRIEL**

La section précédente nous a permis de définir toutes les notions techniques relatives à la technologie membranaire pour la clarification, le fractionnement et/ou la purification des composants présents dans une solution biologique. Nous avons ainsi mis en évidence l'attractivité de ces procédés pour la valorisation des fructanes d'agave. Mais, afin de garantir le succès de l'intégration de ces techniques membranaires au sein d'un procédé industriel global, nous nous sommes appuyés sur le travail de thèse d'E. Darnon (2001). Cette dernière a en effet développé une méthodologie pour faciliter l'intégration d'une étape d'ultrafiltration dans un procédé de purification. Cette démarche comprend trois étapes principales.

##### **1. Analyse du procédé :**

Cette étape correspond principalement à l'analyse du procédé. Il s'agit de préciser les objectifs de la séparation (purification/fractionnement/concentration), d'identifier les contraintes et de définir les spécifications à atteindre (flux minimal, degré de séparation/concentration). Cette analyse permet de définir la technique membranaire la plus appropriée et de pré choisir parmi les différents matériaux membranaires existants sur le marché, la membrane susceptible de répondre aux exigences du procédé.

##### **2. Choix des membranes ;**

La 2ème étape correspond au choix définitif de la membrane. A partir de différents tests réalisés en cellule agitée ou sur de petits modules de filtration tangentielle, on isole parmi les membranes pré-sélectionnées, la ou les membranes idéales. A l'issue de cette étape, on peut apporter une réponse quant à la faisabilité de la séparation.

##### **3. Modélisation et Simulation :**

Cette étape consiste en la confrontation des premiers résultats expérimentaux aux modèles de transfert théoriques trouvés dans la littérature. Cette modélisation repose sur la résolution des équations de bilan matière, grâce un certain nombre d'hypothèses réalistes (en accord avec les premiers résultats expérimentaux) et aux choix de modèles de transferts pertinents, ceci afin de réduire le nombre d'essais expérimentaux généralement coûteux.



Les données issues de cette modélisation sont ensuite introduites dans les calculs de simulation de façon à effectuer un premier dimensionnement de l'unité à l'échelle industrielle. Ainsi on vérifie à ce stade, la faisabilité et la viabilité économique du procédé.

Si l'on décide de poursuivre le projet, on effectue alors une deuxième simulation à l'échelle pilote que l'on confronte aux résultats d'essais expérimentaux conduits à cette même échelle. Si un écart trop important apparaît, les hypothèses de transfert sont affinées et une nouvelle simulation est réalisée puis comparée à de nouveaux résultats expérimentaux...

Après avoir parcouru plusieurs fois cette boucle et une fois l'écart simulation/expérience ramené à un niveau acceptable, on peut proposer avec les hypothèses de travail associées, une dernière simulation qui conduira à un dimensionnement fiable de l'unité industrielle.

En raison de l'état actuel des connaissances, il n'est pas envisageable dans le cadre de cette thèse, de mettre en œuvre cette démarche dans sa globalité. Nous nous sommes simplement inspirés des deux premières étapes pour définir les différents axes de notre étude à savoir :

- La caractérisation du jus d'agave (aguamiel) et des fructanes extraits du coeur et des feuilles d'*Agave tequilana* et pulquéro afin d'identifier et de caractériser les molécules d'intérêt et d'identifier la ou les techniques membranaires adéquates pour la séparation.
- La sélection de membranes et l'étude des conditions expérimentales pour le fractionnement des fructanes issus des jus d'agaves.

## **CHAPITRE 2 MATERIEL ET METHODES**

### **I. MATERIEL BIOLOGIQUE**

#### **A. AGUAMIEL**

Les échantillons d'aguamiel ont été préparés dans la région de Lomas de Romero, Tecamachalco, Puebla, Mexique (18° 53' N, 97° 44' W). Les plantations sont situées à une altitude de 2020 m. Trois plantes d'*Agave mapisaga*, communément connues comme *Agave pulquéro Blanco*, ont été choisies en début de floraison, pour cette étude. Les trois agaves ont été traitées suivant les procédés traditionnels d'obtention du jus d'agave ou aguamiel (1.I.E.1.a), la production d'aguamiel a commencé le 1<sup>er</sup> juin 2005.

Pour étudier les changements de composition de l'aguamiel, 1 L de jus de chaque agave ont été collectés à 0,5 ; 1,0 ; 2,3 ; 3,5 et 4,5 mois pendant la période de production. Immédiatement après le prélèvement des échantillons, 0,02 % d'azide de sodium ont été ajoutés afin d'éviter la croissance de micro-organismes puis les échantillons ont été placés dans de la glace pendant le trajet du champ expérimental à la chambre de congélation (30 min). Les échantillons ont ensuite été stockés à -20°C jusqu'au dernier prélèvement de l'expérience.

Les quinze échantillons sous forme congelée, ont été placés dans une caisse thermique de polyéthylène pendant les 48 heures de transport entre le Mexique et la France. Une fois réceptionnés, les échantillons ont été décongelés, agités *et* aliquotés puis recongelés jusqu'à leur analyse.

#### **B. CŒUR ET FEUILLES D'AGAVE PULQUERO ET TEQUILANA**

Des échantillons de cœur et de feuilles de deux plantes d'agave pulquéro (une avant et une après la production d'aguamiel) de la région de Lomas de Romero (Tecamachalco Mexique ) et d'un plant d'*Agave tequilana* de la région de Tequila (Jalisco Mexique) ont été utilisés pour l'extraction des fructanes.

### 1. Extraction de la fraction soluble dans l'eau du cœur et des feuilles d'*Agave pulquéro* et *tequilana*

150 g de pulpe d'agave sont coupés en morceaux de 5x5 cm et mixés pendant trois minutes dans un Waring Blendor en présence de 250 mL d'eau ultra pure à 80°C. La pulpe est maintenue à 80 °C pendant 15 min sous agitation afin d'améliorer l'extraction tout en inactivant les enzymes présentes dans le milieu. Les fibres insolubles sont ensuite éliminées de la fraction soluble par centrifugation à 14000 g pendant 30 min à 10°C. De l'azide de sodium ( $\text{NaN}_3$ ) est ajouté à raison de 0,02% final.

### 2. Purification de fructanes de haut DP « Agavines »

Les fructanes de haut DP sont obtenus par précipitation à l'éthanol. Brièvement, 32 mL d'éthanol à 95 % sont ajoutés à 6 mL de surnageant d'extrait de cœur d'agave, de façon à obtenir une concentration d'éthanol finale de 80 % (V/V). Après 2 heures à 4°C, le précipité formé est centrifugé à 14000g pendant 30 min à 10 °C. Le surnageant est éliminé et le culot lavé une fois par de l'éthanol 80% puis il est lyophilisé et stocké en vue d'analyses de composition.

## C. SOLUTION MODELE DES AGAVINES

En raison des problèmes de conservation du matériel végétal pendant le transport mais aussi compte tenu des grandes quantités nécessaires pour les essais de filtration sur membranes, des solutions modèles de fructanes d'agave ont été préparées à partir d'une poudre commerciale (FRUCTAGAVE-PR-95) fournie gracieusement par la société Agaviotica S.A. de C.V.( Distrito B4 # 433, Colonia Leones, C.P. 64600. Monterrey, Nuevo León, México). Les données des fournisseurs concernant cette poudre sont rassemblées dans le Tableau 6 du chapitre 1.II.E.

## D. JUS BRUT D'AGAVE TEQUILANA

Afin de valider les essais de fractionnement des polysaccharides d'*Agave tequilana*, réalisés sur solution modèle, l'entreprise Agaviotica nous a également fourni 15 litres de jus brut, matière première servant à la fabrication de la poudre commerciale (FRUCTAGAVE - PR-95). Ce jus préalablement additionné d'azide de sodium a été congelé et acheminé en transport express du Mexique vers la France. Une fois réceptionné, ce jus a été décongelé, agité *et* aliquoté puis recongelé jusqu'à son utilisation pour les essais de filtration.

## II. METHODES ANALYTIQUES

### A. ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES

#### 1. Acidité Titrable

L'acidité titrable est déterminée à l'aide d'un titrateur TT processus 2 (TACUSSEL) équipé d'une burette automatique contenant une solution de NaOH 0,1 N. L'acidité est exprimée en Eq.L<sup>-1</sup>. Au Mexique, l'acide lactique est considéré comme l'acide organique majoritaire et de ce fait, l'acidité est exprimée en mEq.L<sup>-1</sup> de cet acide (Norme NMX-V-022 1972).

#### 2. Matière sèche

5 mL d'échantillon de masse  $m_0$  sont déposés dans une coupelle de masse  $m_1$  remplie de sable de Fontainebleau préalablement séché. La coupelle est placée dans une étuve à 105°C pendant 48 h. Au sortir de l'étuve, la coupelle est refroidie dans un dessiccateur puis pesée. Sa masse est notée  $m_2$ . Le calcul de la matière sèche (MS) est le suivant :

$$\text{MS (\%)} = 1 - \frac{(m_0 + m_1) - m_2}{m_0} \times 100 \quad \text{Eq. 2,1}$$

#### 3. Cendres

5 mL d'échantillon de masse  $m_0$  sont déposés dans une capsule en silice de masse  $m_1$  préalablement séchée. La capsule est ensuite placée dans une étuve à 105°C pendant 24 h puis dans un four à 560°C pendant 5 h pour incinération. La capsule est ensuite refroidie dans un dessiccateur puis pesée. Sa masse est notée  $m_2$ . La quantité de cendres est déterminée par calcul en utilisant la formule suivante :

$$\text{Cendres (\%)} = 1 - \frac{(m_0 + m_1) - m_2}{m_0} \times 100 \quad \text{Eq. 2,2}$$

#### 4. Cations

Les cations ont été dosés par spectrométrie d'absorption atomique à l'aide d'un appareil "Varian SpectrAA 220 FS", équipé des lampes adéquates pour le dosage de chaque

élément ainsi que d'un injecteur automatique d'échantillon et du logiciel d'analyse « spectra AA ». Cette analyse repose sur la mesure de l'absorption des atomes restés à l'état fondamental lorsque l'échantillon est éclairé par une source de longueur d'onde  $\lambda$  (nm) (pour Na  $\lambda$ = 589,6 nm; K  $\lambda$ =769,9 nm; Mg  $\lambda$ = 285,2 nm ; Ca  $\lambda$ =422,7 nm ; Mn  $\lambda$ =279,5 nm ; Cu  $\lambda$ =324,8 nm; Fe  $\lambda$ =248,3 nm; Co  $\lambda$ =240,7 nm). Afin de réaliser cette analyse, les éléments minéraux des cendres sont préalablement dissous dans 5 mL d'acide chlorhydrique 1N.

## 5. Dosage des Protéines

Les protéines sont dosées par la méthode de Lowry après précipitation sélective des protéines en milieu acide. L'acide phosphotungstomolybdique contenu dans le réactif de Folin Ciocalteu est réduit par les protéines donnant une coloration bleue caractéristique dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en protéines.

On ajoute 500  $\mu$ L d'acide trichloroacétique 10% (TCA) à 200  $\mu$ L d'échantillon comprenant une teneur en protéines comprise entre 20 et 100  $\mu$ g ainsi qu'à une gamme étalon de 0 à 100  $\mu$ g de Sérum Albumine Bovine (SAB Sigma réf : A-7030). Après agitation au vortex et centrifugation (5min, 7826g, 10°C), le surnageant est aspiré avec une trompe à vide munie d'une pipette à constriction puis on ajoute 200  $\mu$ L de NaOH 0,2 N au culot et on laisse l'ensemble à 60 °C pendant 1 heure afin de dissoudre le précipité. On procède ensuite au dosage des protéines en suivant le protocole de Lowry (Lowry *et al.* 1951) c'est à dire en ajoutant 1 mL de solution C<sup>(\*)</sup> dans tous les tubes (gamme étalon et essais). Après une attente de 10 minutes, 0,1 mL de réactif de Folin Ciocalteu (dilué à 50% dans de l'eau ultra pure) sont ajoutés et le mélange est agité. Après 30 min de réaction, on lit l'absorbance à une longueur d'onde de 750 nm.

(\*)C : Solution préparée à partir de 25 mL d'une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% dans NaOH 0,1M et de 0,5 mL d'autre solution de CuSO<sub>4</sub> à 0,5% en présence de tartrate de potassium et de sodium à 1%.

## 6. Identification et quantification des acides aminés

L'identification et la quantification des acides aminés ont été faites par CLHP avec un système de chromatography Dionex, équipé d'un détecteur DAD UVD 340U et d'une colonne Uptisphere UP5ODB-25QS (250 x 4.6 mm, 5 $\mu$ m) précédée d'une colonne de garde (Uptisphere UP5OBD). Les acides aminés ont été injectés avec un mélange de 2 solvants (78:22 v/v) ; solvant A: 9 mM sodium dihydrogénophosphate, 4% diméthylformamide et 0.1

% triéthylamine (TEA) pH 6.55 et solvant B: 80% (v/v) acétonitrile/eau à un débit de 1 mL.min<sup>-1</sup>. La détection est faite à 436 nm. Des solutions standards Sigma (Ref. AA-S18, T-0254, UN 2129) ont été utilisées comme références.

## **B. ANALYSE DES SUCRES**

### **1. Réfractométrie**

L'indice de réfraction des échantillons est mesuré à l'aide d'un réfractomètre ABBE et les résultats sont exprimés en degrés Brix (°Brix). Sachant qu'un degré Brix correspond à environ 10 g.L<sup>-1</sup> de sucres, cette méthode permet une évaluation approximative de la teneur en sucres totaux des échantillons.

### **2. Sucres totaux**

Les sucres totaux ont été dosés par la méthode Dubois (1956). 1 mL de solution de concentration inférieure à 50 mg.L<sup>-1</sup> est ajouté à 1 mL d'une solution de phénol à 5%, l'ensemble est agité et placé dans un bain d'eau glacée. On ajoute ensuite 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré (95-97%). Après 30 min de réaction, l'absorbance à 490 nm est mesurée et les résultats sont exprimés en g.L<sup>-1</sup> d'équivalent fructose grâce à une courbe de calibration réalisée avec une solution de fructose de concentrations comprises entre 0-50 mg L<sup>-1</sup> (Dubois *et al.* 1956).

### **3. Dosage spécifique du glucose, du fructose et du saccharose**

#### **a. Dosage par chromatographie liquide haute performance**

L'analyse quantitative du glucose, du fructose et du saccharose a été réalisée par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP), à l'aide d'un ensemble composé d'une pompe Water 515, d'un réfractomètre différentiel Wyatt, d'une boucle d'injection de 20 µL et d'une colonne Sugar PaK 1 ; 6,5 x 300 mm (Ref :WAT085188) empaqueté de microparticule d'échange- cation en forme de gel de calcium. La phase mobile d'élution est de l'EDTA à 50 mg.L<sup>-1</sup>, la température de la colonne est réglée à 90 °C et le débit d'élution fixé à 0,4 mL.min<sup>-1</sup> avec un étalonnage externe. Avant leur injection, les échantillons sont filtrés sur une membrane en acétate de cellulose de 0,45 µm ( Millipore référence HVLPO25000 ).

**b. Méthode enzymatique**

Les analyses du D-glucose, du D-fructose et du sucrose ont aussi été réalisées à l'aide d'un kit enzymatique « analyse biochimique *et alimentaire* » (Boehringer Mannheim UV method 10 716 260 035 R-Biopharm). La procédure d'analyse a été mise en œuvre selon les instructions du fournisseur. Les échantillons ont été centrifugés (17 600 g, 10 min, 10°C) avant le dosage.

**C. CARACTERISATION DES FRUCTANES****1. Fractionnement des Fructanes par chromatographie d'exclusion stérique**

Les polysaccharides diffèrent notamment par la nature de leurs résidus, ainsi que par leur degré de polymérisation, donc par leur volume hydrodynamique. Le principe de la chromatographie d'exclusion stérique consiste à séparer les polysaccharides selon ce volume hydrodynamique.

Le gel utilisé est constitué de billes de porosité déterminée. Suivant leur taille, les molécules sont éluées par une phase mobile liquide et pénètrent ou non dans ces pores. Les molécules ne pénétrant pas dans les pores sortent les premières alors que les plus petites, parcourant un volume de colonne plus important sortent en dernier. Une relation logarithmique existe entre le volume hydrodynamique de la molécule et son volume d'élution. Par calibration simple ou universelle, on définit une corrélation entre volume hydrodynamique et masse, ce qui permet de déterminer la masse du composé à partir de son temps d'élution. Pour des polysaccharides, il est nécessaire d'utiliser une phase mobile contenant des électrolytes afin d'ajuster la force ionique du milieu et d'éviter la formation d'agrégats ou d'interactions avec le support.

**a. Fractionnement de l'aguamiel par chromatographie d'exclusion stérique**

Les échantillons d'aguamiel ont été préalablement centrifugés (17 600 g, 10 min, 10°C) puis injectés avec une phase mobile de formiate d'ammonium 30 mM à pH 5,8 sur deux colonnes d'exclusion stérique différentes composées de billes de dextranes liées à de l'agarose hautement réticulé.

Une colonne **Superdex 75 Hiload HR** (Amersham Biosciences, référence : 17-1047-01), (1cm DI x 30 cm de long ; volume total 24 mL) à base de particules dont le domaine de

fractionnement est compris entre 3 et 70 kDa pour des protéines globulaires et utilisé avec un débit d'élution est de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>.

Une colonne **Superdex 30 pg HiLoad 16/60** (Amersham Biosciences, référence: 17-139-01) (1,6 cm DI x 60 cm de long; volume total 120 mL) avec un domaine de fractionnement inférieur à 10 kDa pour des protéines globulaires avec un débit d'élution de 1mL.min<sup>-1</sup>. L'élution des solutés est suivie par réfractométrie (réfractomètre ERC-7512, Erma).

#### b. Fractionnement des extraits de cœur d'agave

Les extraits obtenus à partir de la pulpe des cœurs d'agave ont été fractionnés sur une colonne **Biogel P10** (BIO-RAD, Ref. 150-41403). Cette colonne est principalement utilisée pour le fractionnement des protéines et des polypeptides. Elle est composée de gel de polyacrylamide de 45-90 µm. Son domaine de fractionnement est compris entre 1,5 et 20 kDa. L'élution est réalisée avec de l'eau ultra pure à un débit de 10 à 15 mL.h<sup>-1</sup>. La détection en sortie de colonne est réalisée par réfractométrie (réfractomètre ERC-7512, Erma, Japon).

## 2. Analyse des masses molaires apparentes

Les fractions solubles ont été analysées par CLHP d'exclusion stérique sur deux colonnes Shodex (OH-pak KB-803 et KB-805 (0,8 x 30 cm; Showa Denko, Japon)) montées en série et présentant ainsi un domaine de fractionnement compris entre 10 et 8x10<sup>3</sup> kDa. L'élution s'effectue avec une solution de LiNO<sub>3</sub> (100 mM) à un débit de 1 mL.min<sup>-1</sup> et la détection est suivie par réfractométrie (Réfractomètre ERC-7512 Erma, Japon). La calibration des colonnes a été réalisée par injection de solutions de pullulanes décrits dans le Tableau 10, et conduit à l'équation suivante, où t<sub>R</sub> est le temps de rétention :

$$\text{Log Mw} = 28,341 - 1,0652 \times t_R \quad \text{Eq. 2,3}$$

**Tableau 10 Description des pullulanes utilisés pour la calibration des colonnes Shodex.**

Pullulane étalon	Taille ( kDa )	Temps de rétention ( min )
800	853	13,98
400	380	14,57
200	186	15,03
100	106	15,65
50	48,1	16,51
20	23,7	17,25
10	12,2	17,82
5	5,8	18,46



### 3. Polydispersité des fructanes

La longueur des chaînes de fructanes a été déterminée qualitativement par Chromatographie Liquide d'Echange d'Anion Haute Performance (CLEAHP) sur un système Dionex DX-300 (Sunnyvale, CA 94088, U.S.A.) équipé d'une cellule de détection par Ampérométrie à Champs Pulsé (DACP). Les échantillons sont injectés sur une colonne CarboPac PA100 de chez DIONEX (0,4 x 25 cm) thermostatée à 25°C, précédée d'une précolonne CarboPac PA100 DIONEX (0,4 x 5 cm) et l'élution à un débit de 1 mL.min<sup>-1</sup> est réalisée avec un gradient d'acétate de sodium (0-600 mM) en hydroxyde de sodium 100 mM. Les degrés de polymérisation (DP) et la polydispersité sont estimés par comparaison aux temps d'élution de quatre standards à savoir : du 1-Kestose "G-F<sub>2</sub> = DP 3" (Fluka, 72555 C<sub>18</sub> H<sub>32</sub> O<sub>16</sub> MW 504.44), du Nystose "G-F<sub>3</sub> = DP 4" (Fluka, 56218 C<sub>24</sub> H<sub>42</sub> O<sub>21</sub> MW 666.58) et de deux inulines de différentes origines: inuline de Topinambour « Jérusalem Artichokes » (SIGMA I-2880) et inuline de chicorée (SIGMA I-2255).

Afin d'améliorer la séparation et d'affiner l'analyse des fructo-oligosaccharides, les gradients d'élution CLEAHP sont adaptés au type d'échantillon analysé : trois gradients différents ont ainsi été mis au point et utilisés, tous les programmes ont débuté après 10 min de rééquilibrage aux conditions initiales.

a. Programme 1 : Séparation des DP compris entre 1 et 15.

Ce gradient est spécifique pour les échantillons de faible DP (compris entre 1 et 15) et utilisé pour la détermination de la polydispersité des fructanes présents dans l'aguamiel. La colonne est préalablement conditionnée pendant 10 min (élution à 1 mL.min<sup>-1</sup> avec une solution d'acétate de sodium 6 mM en NaOH 0,1M). A 10 min, 30 µL d'échantillon sont injectés puis élués par un premier gradient linéaire en acétate (6 à 240 mM) de 10 à 60 min, puis par un deuxième gradient linéaire en acétate (240-600 mM) de 60 à 70 min.

b. Programme 2 : Séparation des DP compris entre 1 et 50.

Ce gradient spécifique pour les échantillons de DP compris entre 1 et 50 est utilisé pour la détermination de la distribution des fructanes de l'inuline de chicorée.

La colonne est conditionnée pendant 10 min par une élution à 1 mL.min<sup>-1</sup> avec une solution d'acétate de sodium 120 mM en NaOH 0,1M. A 10 min, 30 µL d'échantillon sont injectés et élués avec le même solvant pendant 5 min. Puis, un gradient linéaire en acétate de

120 à 360 mM est appliqué de 15 à 60 min. Enfin l'élution est terminée par application d'un gradient linéaire en acétate de 360 à 600 mM pendant 10 min.

c. Programme 3 : Séparation des haut DP compris entre 1 et 80.

Ce gradient spécifique pour les échantillons de DP compris entre 1 et 80 est utilisé pour la détermination de la polydispersité des fructanes des extraits d'agaves. La colonne est conditionnée pendant 10 min par une élution à 1 mL.min<sup>-1</sup> avec une solution d'acétate de sodium 48 mM en NaOH 0,1M. A 10 min, 30 µL d'échantillon sont injectés et élués par un gradient linéaire en acétate (48 à 210 mM) de 11 à 30 min. Au-delà, la concentration en acétate est augmentée par paliers : de 30 – 34,9 min, la concentration en acétate est maintenue à 210 mM, de 35 à 39,9 min à 240mM, de 40 à 44,9 min à 270 mM, de 45 à 49,9 à 300mM min, de 50 à 54,9 à 330 mM min, de 55 à 59,9 min à 360mM, de 60 à 64,9 min à 390 mM, de 65 à 69,9 min à 420mM et enfin de 70 à 85 min à 600 mM.

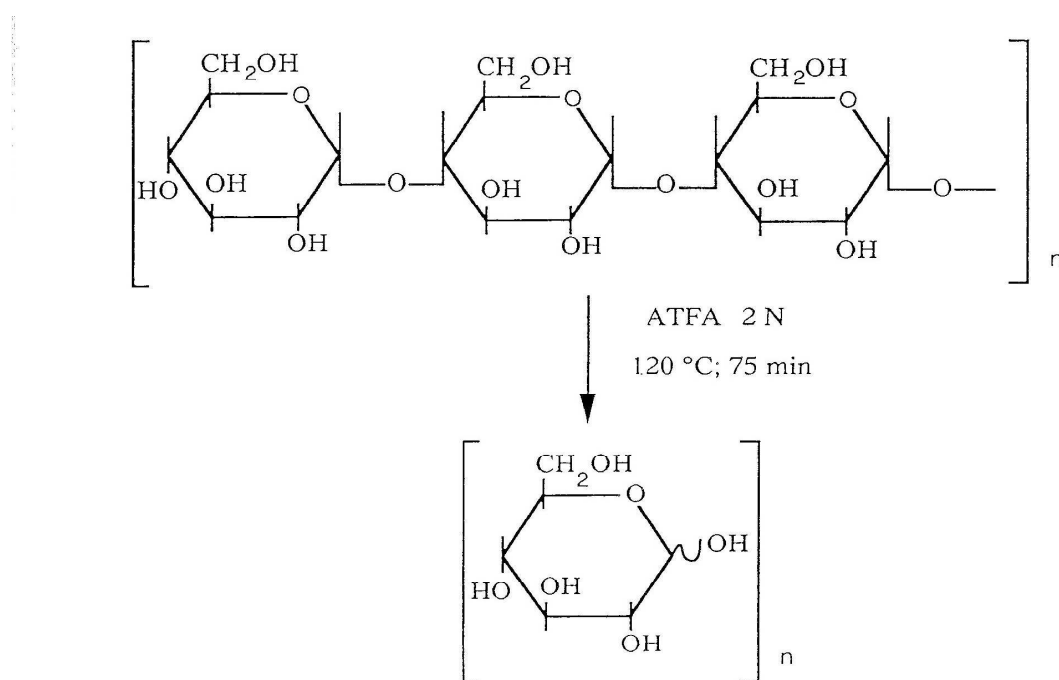
#### 4. Analyse de la composition en oses neutres.

L'analyse de composition a été effectuée selon la méthode décrite par Albersheim *et al.* (Albersheim *et al.* 1967). Les polyosides (1 mg) sont hydrolysés en milieu acide (acide trifluoroacétique 2M, 0,5 mL) pendant 1h15 à 120°C afin de libérer les oses constitutifs (Figure 12a) puis séchés sous air avant ajout des étalons internes (100 µL d'inositol, à 1 mg.mL<sup>-1</sup>, et 100µL allose, à 1 mg.mL<sup>-1</sup>). Les échantillons sont à nouveau séchés puis réduits par 500 µL de borohydrure de sodium (NaBH<sub>4</sub> dans NH<sub>3</sub>, 1N, 20 mg.mL<sup>-1</sup>) pendant 1 heure à 60°C. Après réduction, 500 µL d'acétone sont ajoutés pour stopper la réaction et permettre un séchage sous air plus rapide. Les échantillons sont ensuite dissous dans 100 µL d'acide acétique glacial puis acétylés par addition de 500 µL d'acétate d'éthyle, 1,5 mL d'anhydride acétique et 50 µL d'acide perchlorique à 70% (v/v) (Figure 12b). Après 15 minutes au bain à ultrasons, l'excès d'anhydride acétique est éliminé par 5 mL d'H<sub>2</sub>O en présence de 50 µL de 1-méthylimidazole. Les dérivés réduits et acétylés sont alors extraits par 500 µL de chloroforme. Après décantation, la phase organique est récupérée et transférée pour être conservée au congélateur jusqu'à injection. (Albersheim *et al.* 1967).

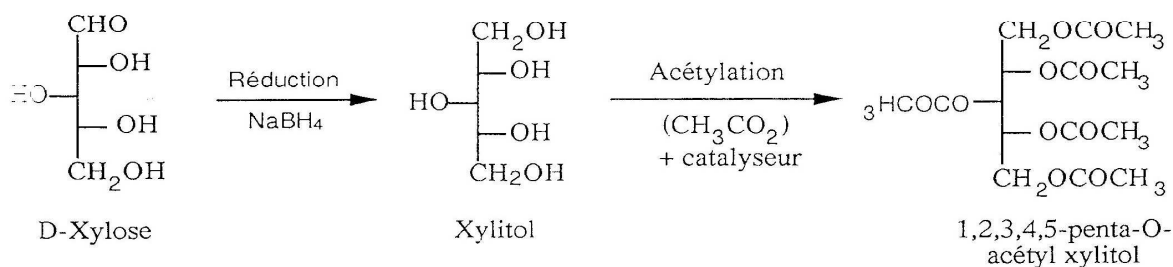
Les unités osidiques ainsi transformées appelées acétates d'alditols, sont séparées par chromatographie en phase gazeuse sur une colonne capillaire en silice fondue greffée à 50 % par du diméthylpolysiloxane et à 50 % par du cyanopropylsiloxane (OV-225) (L = 30 m, ID =

0,32 mm, film = 0,5  $\mu\text{m}$ ) (température de l'injecteur : 250°C, injecteur split : 1/10, gaz vecteur  $\text{H}_2$ , débit 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ).

La détection se fait par ionisation de flamme. Les facteurs de réponse sont calculés à l'aide d'un mélange d'oses standards et d'une solution étalon d'allose (1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Les résultats sont exprimés en anhydromoles et sont corrigés d'un facteur de polymérisation de 0,9 pour les hexoses, de 0,88 pour les pentoses (et de 0,89 pour les méthyls-pentoses s'ils sont présents).



a- Exemple d'hydrolyse d'un polysaccharide



b - Réduction et acétylation d'un monosaccharide

Figure 12 : Transformation des oses en acétates d'alditols.

## 5. Analyse structurale par perméthylation des polysaccharides

L'analyse de structure par perméthylation permet de déterminer la nature des liaisons osidiques des oses constitutifs des polysaccharides. Dans un premier temps, les hydroxyles libres (ou engagés dans une liaison de type ester labile en milieu alcalin) des polysaccharides sont méthylés. Dans un deuxième temps, le polysaccharide est hydrolysé, libérant ainsi des oses partiellement méthylés. Après réduction et acétylation, les composés partiellement méthylés et acétylés sont séparés et identifiés par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (Figure 13).

Les polysaccharides (1 à 2 mg) ont été méthylés selon la méthode d'Hakomori (Hakomori 1964). Les polysaccharides sont passés durant 24 h à l'étuve Chopin à 50°C sous  $P_2O_5$  pour être totalement anhydre, puis placés dans des piluliers purgés à l'argon. On ajoute alors 0,5 mL de diméthylsulfoxyde (DMSO) sous agitation pour permettre une bonne dissolution des produits. Puis 0,5 mL d'anion diméthyl sulfinyl de sodium sont ajoutés dans le milieu sous agitation pendant 1h. Les piluliers sont ensuite refroidis au congélateur. Au milieu réactionnel congelé, 0,5 mL d'iodure de méthyle en excès sont ajoutés. La réaction exothermique est laissée sous agitation à température ambiante pendant 1 h. On procède alors à l'élimination de l'iodure de méthyle, très volatil, en plaçant les échantillons sous flux d'air pendant 10 min. Les polysaccharides méthylés sont extraits par 2 mL d'un mélange chloroforme/méthanol (2/1, v/v) et cette phase organique est alors lavée 5 fois avec 2 mL d' $H_2O$  pour éliminer le DMSO en excès, puis séchée sous air (Hakomori 1964).

L'hydrolyse des polysaccharides méthylés puis la réduction et l'extraction des acétates d'alditols partiellement méthylés obtenus se font comme décrit ci-dessus.

Les unités osidiques ainsi transformées sont séparées en CPG sur une colonne capillaire en silice fondue greffée à 100% par du diméthylpolysiloxane (OV-1) (L = 30 m, ID = 0,25 mm, film = 0,25  $\mu$ m) (température de l'injecteur : 250°C, injecteur splitless : 1/20, gaz vecteur  $H_2$ , débit 2 mL min<sup>-1</sup>). La température de la colonne est d'abord maintenue constante à 170°C pendant 15 minutes puis augmentée de 1°C.min<sup>-1</sup> jusqu'à 210°C.

La détection se fait par ionisation de flamme. L'identification des pics est réalisée sur la base des temps de rétention relatifs par rapport à un étalon interne (ici une solution d'inositol à 1 mg.mL<sup>-1</sup>) trouvés dans la littérature (Barreto-Bergter *et al.* 1981; Basic *et al.* 1984; Harris 1984; Lomax *et al.* 1985), mais aussi sur les tables de temps de rétention établies au

laboratoire en méthylant différents polysaccharides de structure connue et confirmée par couplage avec un spectromètre de masse, les schémas de fragmentation des acétates d'alditol partiellement méthylés étant bien connus (Jansson *et al.* 1976). Les pourcentages molaires de chaque acétate d'alditol partiellement méthylé ont été calculés par rapport à la somme totale des pics identifiés en utilisant les surfaces de chaque pic corrigées par les facteurs de réponse établis par (Sweet *et al.* 1975).

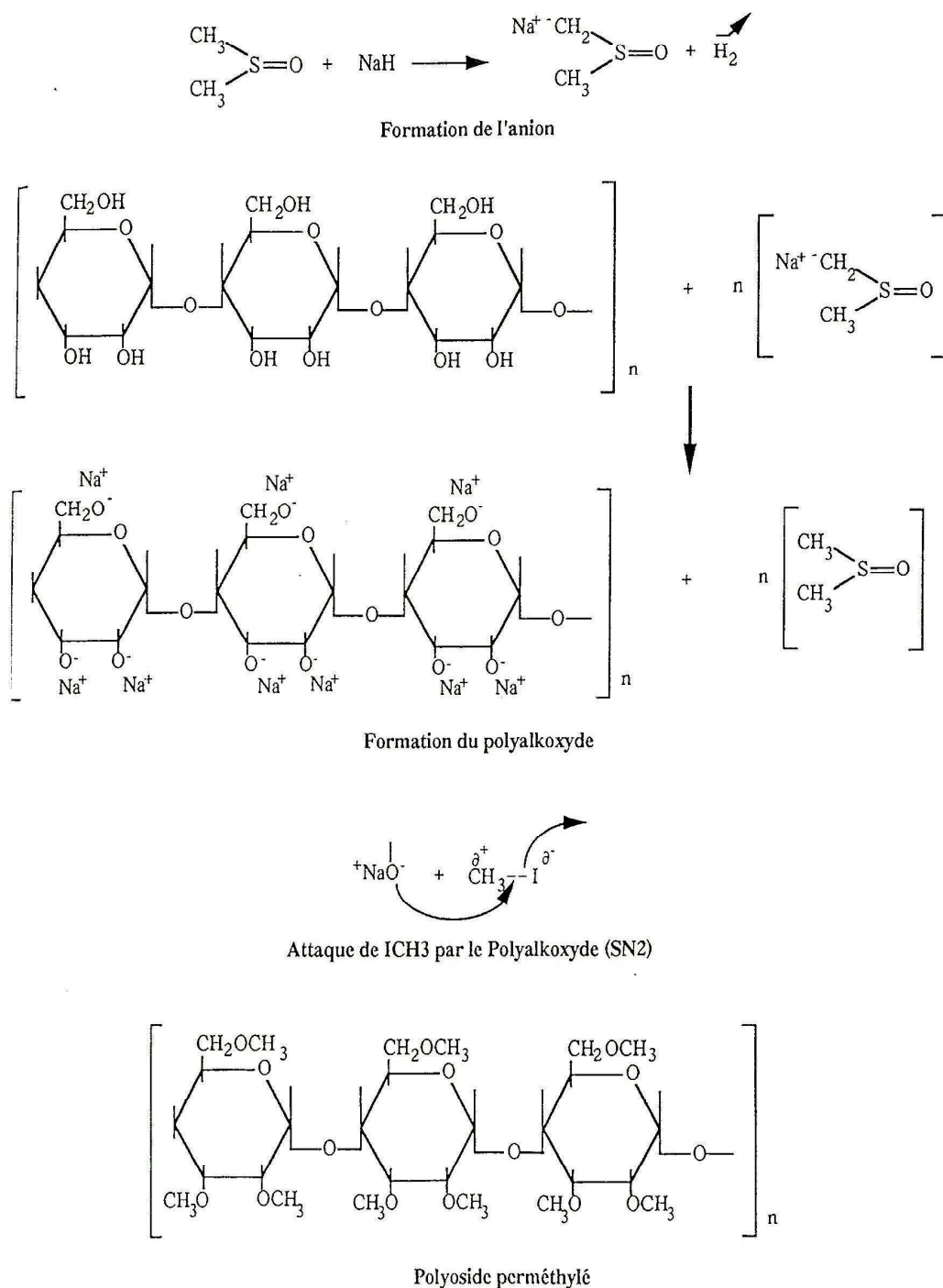


Figure 13 : Réaction de perméthylation des polysaccharides.

**D. METHODES ENZYMATIQUES****1. Détermination du degré de polymérisation et quantification des fructanes**

50  $\mu$ L d'une préparation commerciale d'inulinase d'*Aspergillus niger* (Fructozyme L®, Novozymes) sont ajoutés à 5 mL d'aguamiel (dilué 10 fois dans du tampon acétate 100 mM, pH 4,7 ). Le mélange est incubé à 50°C pendant 12 h. Les échantillons sont ensuite placés dans un bain-marie à 100°C pendant 10 min. L'analyse des sucres à l'aide du kit enzymatique R-Biopharm permet la détermination du glucose<sub>total</sub> et du fructose<sub>total</sub>. En parallèle, un deuxième essai (blanc) est exécuté dans les mêmes conditions avec au préalable inactivation des enzymes par chauffage à 100 °C pendant 10 min.

Le degré moyen de polymérisation (DP<sub>moyen</sub>) est alors calculé selon l'équation (Waleckx *et al.* 2008):

$$DP_{moyen} = F / G + 1 \quad \text{Eq. 2,4}$$

Où:  $F = \text{fructose}_{total} - \text{fructose}_{libre} - 0.52 * \text{sucrose}_{libre}$

$G = \text{glucose}_{total} - \text{glucose}_{libre} - 0.52 * \text{sucrose}_{libre}$

La somme F + G est considérée comme la concentration en fructane des échantillons analysés.

**2. Recherche d'activités d'enzymatiques endogènes dans l'aguamiel**

20 mg d'inuline de chicoré (Sigma – I-2255) sont dissous dans 2 mL d'aguamiel contenant 0,02 % de NaN<sub>3</sub>. 1 mL de cette solution (essai) est incubé directement à 50°C pendant 110 h tandis que l'autre ml (témoin) est chauffé à 100 °C pendant 10 minutes pour inactiver d'éventuelles enzymes endogènes avant d'être incubé à 50°C pendant 110 h.

Une aliquote de ces deux solutions est prélevée avant et après incubation, centrifugée (17600g, 10 min, 10°C) puis diluée 20 fois et soumise à l'analyse par CLEAHP. Un gradient spécifique des produits dégradés par hydrolyse est programmé comme décrit ci-après. Les colonnes sont équilibrées à 25 °C avec l'acétate de sodium 120 mM en NaOH 100mM au débit de 1 mL.min<sup>-1</sup> pendant 10 minutes avant chaque injection. 30  $\mu$ L d'échantillon sont

injectés et élués de 11 à 15 minutes dans les conditions initiales puis un gradient linéaire est appliqué jusqu'à 460 mM en acétate de sodium pendant 55 min.

## **E. ANALYSES STATISTIQUES**

Une analyse de la variance (test ANOVA avec un interval de confiance de 95%) a été réalisée pour évaluer d'éventuelles différences significatives entre les échantillons d'aguamiel (incidence de la plante, de la date de prélèvement). Le programme informatique utilisé est Statgraphics 5.1 (Stsc, Rockville, MD).

## **III. METHODES DE FILTRATION**


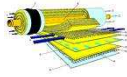

### **A. LES MEMBRANES**

En vue de la clarification et du fractionnement des fructanes présents dans le jus brut d'Agave, différentes membranes organiques et inorganiques ont été utilisées. Les caractéristiques de ces membranes (nature, seuils de coupure, fournisseurs et configurations) sont rapportées dans le Tableau 11.

Les membranes organiques planes ont été mises en oeuvre soit dans une cellule de filtration frontale Amicon<sup>®</sup> de diamètre de 37 ou 76 mm ce qui correspond respectivement à une surface active égale à 16 ou 44 cm<sup>2</sup>, soit dans une cellule de filtration tangentielle Osmonics<sup>®</sup> de dimensions 14cm x 19 cm correspondant à une surface utile de 155 cm<sup>2</sup>.

Les modules spiralés utilisés présentent une surface de filtration effective de 900 cm<sup>2</sup> et les membranes céramiques tubulaires (longueur 250 mm, diamètre extérieur 10 mm, trois canaux de 3,5 mm de diamètre hydraulique) ont une surface effective de 82 cm<sup>2</sup>.

**Tableau 11: Membranes testées en vue de la clarification et du fractionnement des fructanes du jus d'agave.**

Matériau	Seuil de coupure (kD)	Fournisseur	Configuration
PES Polyéthersulfone	30, 50, 100	Millipore	Plane 
	10	Millipore Orelis Osmonic $\alpha$ -Laval Koch	
	5	koch	
PA Polyamide	8	Osmonic	
TF Thin Film	$\leq 1$ GE Sepa™ GH	Osmonic	
	0,15 – 0,3 Desal HL	Osmonic	
CR Cellulose régénérée	1, 5, 10, 30	Millipore	
CR Cellulose régénérée	1, 10	Millipore	Spirale 
Alumine/Titane/Zircone Couche active: Titane; *Zircon	3, 5, 8, 15*, 50*	Tami	Tubulaire multicanaux 
	1	Exekia	Tubulaire



## B. LES UNITES DE FILTRATION

Deux modes de filtration ont été utilisés au cours des étapes de sélection des membranes.

### 1. Filtration frontale (Membrane plane en cellule agitée)

Deux cellules de filtration frontale Amicon® avec agitation de 50 et 350 mL de capacité ont été utilisées au cours des étapes de sélection des membranes, le schéma du montage est représenté Figure 14.

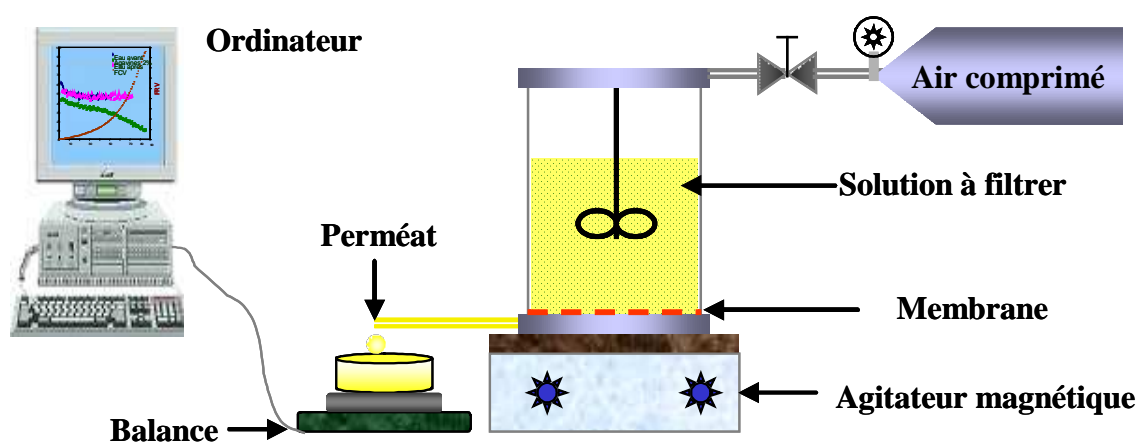


Figure 14 : Module de filtration frontale avec membranes planes: cellule Amicon®.

La membrane organique à tester est découpée au diamètre de la cellule puis placée au fond de celle-ci. Après avoir mis en place l'agitateur aimanté, la cellule est remplie avec la solution à filtrer puis le système est fermé hermétiquement et mis sous pression grâce à une arrivée d'air comprimé. L'agitation est réglée à 350 tours.min<sup>-1</sup> et une pression constante inférieure à 4 bar est appliquée dans la cellule. Le perméat ainsi obtenu est collecté dans un bécher placé sur une balance reliée à un ordinateur. Ainsi l'évolution de la masse de perméat au cours du temps est enregistrée automatiquement et permet de déduire le débit du perméat.

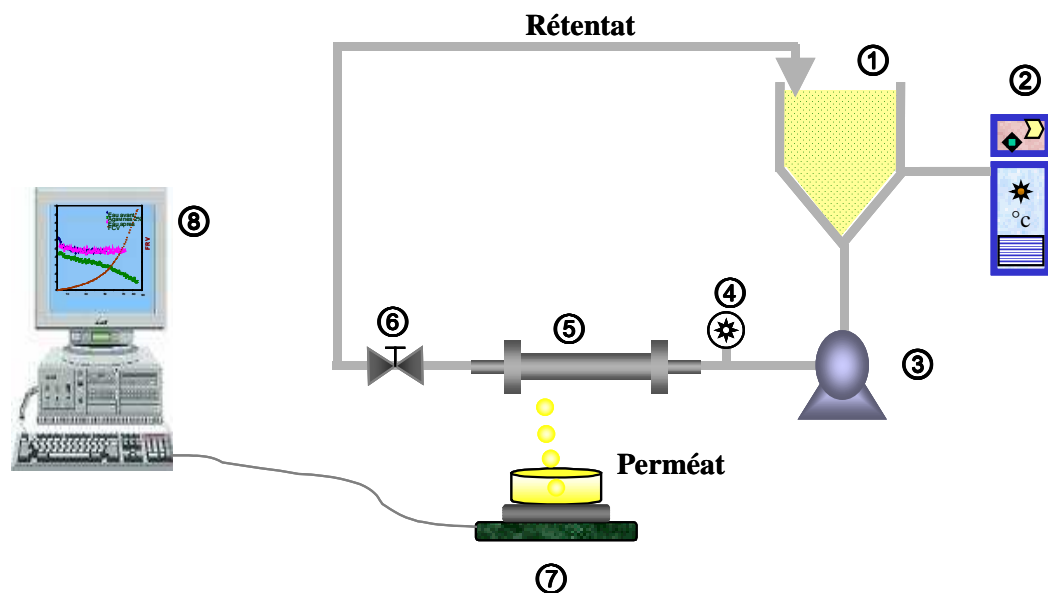
### 2. Filtration tangentielle

Cette unité de filtration pilote représentée sur la Figure 15 comprend:

- Une cuve double enveloppe (1) dans laquelle circule un fluide caloporteur (2) permettant de maintenir constante la température tout au long de l'expérience. En

raison du volume mort important de l'installation, ce bac doit contenir entre 0,5 et 1,5 L de solution pour éviter tout problème de pompage.

- Une pompe (3) munie d'un variateur de fréquence permettant de contrôler la vitesse de la solution d'alimentation.
- Un manomètre (4) et une vanne (6) de contre-pression permettant de contrôler la pression transmembranaire de 0 à 8 bar.
- Un carter membranaire (5). Ce pilote peut accueillir soit un carter tubulaire (longueur de membrane 25 cm, longueur utile 23 cm), soit un carter plan Osmonics® (surface membranaire 14cm x 19 cm, surface utile 155 cm<sup>2</sup>) soit encore un module membranaire sous forme spiralée (*cartouche Millipore* surface utile de membrane 900 cm<sup>2</sup>).
- Une balance (7) reliée à un ordinateur (8) permet d'enregistrer en continu les débits de perméat.



**Figure 15 : Boucle de filtration tangentielle; (1) bac alimentation; (2) régulateur de température; (3) pompe; (4) manomètre; (5) module membranaire; (6) vanne de contre-pression; (7) balance; (8) ordinateur.**

Après la mise sous tension du système, la solution d'alimentation est mise en circulation tangentielle à la membrane, le rétentat est recyclé dans la cuve d'alimentation et le perméat est recueilli dans un becher placé sur la balance. Mis à part les expériences

visant la production de perméat, ce dernier est ensuite recyclé après chaque série de mesures, permettant ainsi de simuler les conditions de fonctionnement en régime permanent.

Lors de l'étude des performances en fonction de la concentration de la solution d'alimentation, la concentration de celle-ci est réduite à intervalles de temps réguliers par ajout d'eau. On obtient alors les valeurs du flux à différentes valeurs du facteur de concentration volumique.

## C. CARACTERISATION DES MEMBRANES

Afin de comparer différentes membranes vis-à-vis d'une application spécifique, nous avons choisi d'utiliser dans un premier temps les critères classiques permettant de quantifier une opération de filtration à savoir : la densité de flux de perméat, la sélectivité et l'indice de colmatage. Dans un second temps, des observations en microscopie électronique à balayage (MEB) ont été réalisées.

### 1. Détermination de la densité de flux de perméat

Toutes les membranes sélectionnées ont été caractérisées selon le protocole schématisé sur la Figure 16 ci-contre.

Les conditions de mise en œuvre des filtrations varient selon le type de module utilisé.

#### a. Filtration en cellule agitée :

Après avoir placé la membrane dans la cellule, cette dernière est remplie d'eau osmosée et mise sous pression (2 bar). On mesure alors le débit à l'eau initial de la membrane ( $J_{\text{eau } 0}$ ).

Puis le réservoir est rempli par la solution à concentrer et on enregistre le débit de filtration en fonction du temps ( $J_s$ ). En fin de filtration, un échantillon de perméat final est récupéré en vue d'analyse. La cellule et la membrane sont ensuite rincées 3 fois à l'eau osmosée puis la cellule est remplie d'eau osmosée afin de mesurer le débit à l'eau après filtration ( $J_{\text{eau } 1}$ ).

#### b. Filtration tangentielle :

Comme pour les essais en mode frontal, les essais réalisés sur le pilote de filtration tangentielle se déroulent en trois temps. Tout d'abord, le débit à l'eau de la membrane propre

( $J_{\text{eau } 0}$ ) est relevé puis on mesure le débit de filtration de la solution ( $J_s$ ) enfin, après avoir rincé pendant 5 minutes sans pression l'installation, on remesure le débit à l'eau ( $J_{\text{eau } 1}$ ). Afin de simuler un régime stationnaire lors des essais de caractérisation des membranes, le perméat et le rétentat sont recyclés (fonctionnement boucle fermée).

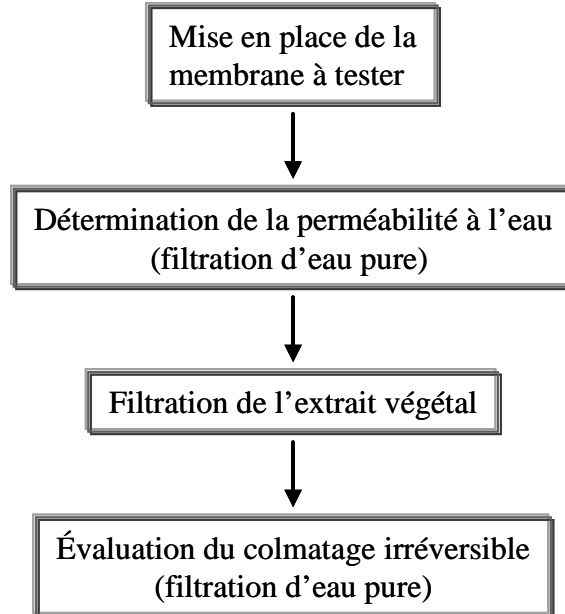


Figure 16 : Protocole de caractérisation des membranes

Tous les débits de filtration sont évalués par pesée et pour faciliter la comparaison des membranes, ils sont rapportés à l'unité de surface et exprimés en  $\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$  en assimilant la densité des jus d'agaves à celle de l'eau et en utilisant l'équation suivante.

$$J = \frac{Q}{A} \quad \text{Eq. 2,5}$$

$J$  est la perméabilité de la membrane,  $Q$  est le débit de la solution exprimé en ( $\text{L.h}^{-1}$ ) et  $A$  est l'aire de surface de membrane ( $\text{m}^2$ ).

Comme au cours des expériences réalisées en cellule agitée, la solution en amont de la membrane se concentre dans le temps, les débits de filtration mesurés pour chacune des membranes testées sont représentés en fonction du facteur de réduction volumique (FRV). Ce facteur est défini par la relation :

$$\mathbf{FRV} = \mathbf{Vo}/(\mathbf{Vo}-\mathbf{Vp})$$

Eq. 2,6

où **Vo** le volume de solution initial**Vp** le volume de perméat

Lors des essais de concentration en continu, le facteur de réduction volumique peut encore être estimé à partir de la relation :

$$\mathbf{FRV\ i} = \frac{\mathbf{Vo}}{\mathbf{Vo} - \int_{t_0}^{t_f} \mathbf{Q} \times dt}$$

Eq. 2,7

où **Q** : le débit de perméat moyen estimé pendant l'intervalle temps dt

## 2. Sélectivité

Il s'agit de comparer la concentration des molécules d'intérêt, ici les fructanes, dans les phases en amont et en aval de la membrane. Généralement la rétention d'un soluté est déterminée à partir de la mesure des concentrations de celui-ci dans le perméat (**Cp**) et dans la solution initiale (**C<sub>0</sub>**), à l'aide de la relation :

$$\% \mathbf{R} = \left(1 - \frac{\mathbf{Cp}}{\mathbf{Co}}\right) \times 100$$

Eq. 2,8

Lors d'essais de concentration, cette rétention peut être calculée au fur et à mesure de l'opération, selon la formule suivante :

$$\% \mathbf{R} = \left(1 - \frac{\mathbf{Cpi}}{\mathbf{Cri}}\right) \times 100$$

Eq. 2,9

où **Cpi** la concentration du soluté dans le perméat à un temps i de la filtration

**Cri** la concentration du soluté dans le rétentat à ce même temps

Dans notre cas, les fructanes représentant un groupe de molécules de tailles polydisperses, leur rétention va donc varier en fonction de leur degré de polymérisation (DP). Nous avons donc choisi pour estimer leur rétention de comparer les profils CLEAHP (cf

section II-C-4) des perméats avec celui de la solution d'alimentation ou avec celui du rétentat correspondant lors des essais de concentration.

Comme nous ne disposions pas de standards pour effectuer un étalonnage, il n'a pas été possible de déterminer les valeurs réelles de la concentration en fructanes pour un DP donné. Toutefois, il est possible de comparer pic par pic la composition de 2 solutions sous réserve que les quantités injectées soient les mêmes et correspondent à une même dilution ce que nous nous sommes attachés à respecter.

Ainsi la quantification des fructanes est réalisée sous forme indirecte à partir de la mesure des hauteurs des pics obtenus sur les profils CLEAHP (Figure 17) et la rétention est calculée selon l'équation :

$$\% R = \left(1 - \frac{h_{p,i}}{h_{0,i}}\right) \times 100 \quad \text{Eq.2,10}$$

où  $h_{p,i}$  : hauteur du pic des fructanes de  $DP_i$  dans le perméat  
 $h_{0,i}$  : hauteur du pic des fructanes de  $DP_i$  dans la solution d'alimentation.

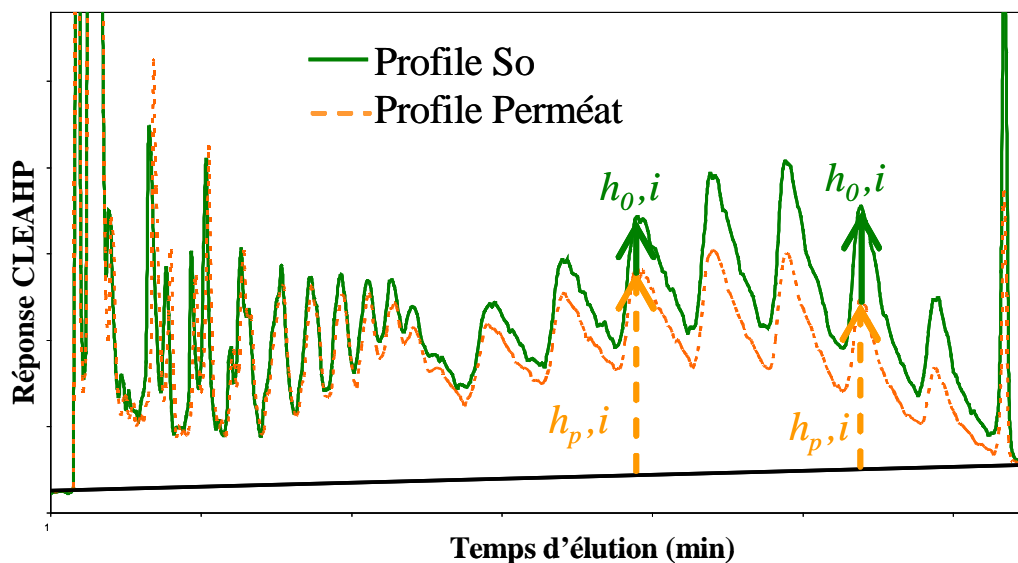


Figure 17 : Représentation schématique des mesures des hauteurs des pics sur les profils CLEAHP pour calculer le taux de rétention.

### 3. Estimation du colmatage des membranes

Le colmatage est estimé grâce à la mesure des flux à l'eau avant et après la filtration et est calculé selon la formule :

$$\% \text{ Colmatage} = \frac{J_{0,eau} - J_{1,eau}}{J_{0,eau}} \times 100 \quad \text{Eq. 2,11}$$

Cet indice est d'autant plus élevé qu'il s'est formé un dépôt irréversible important à la surface de la membrane. Cet indice est purement expérimental et dépend des conditions expérimentales fixées (pression transmembranaire, vitesse tangentielle/agitation, température, conditions de rinçage) qui doivent être identiques pour toutes les membranes comparées.

#### 4. Caractérisation physique

Afin de visualiser la structure des membranes testées, des observations en microscopie à l'aide d'un microscope électronique à balayage à effet de champ (Scanning Electron Microscope s-4500 HITACHI) sont réalisées.

Pour l'observation de la structure interne, les membranes sont cassées dans l'azote liquide afin d'obtenir une tranche nette puis sont métallisées avant observation.

### D. NETTOYAGE DES MEMBRANES

Après utilisation, les membranes sont nettoyées selon la procédure recommandée par le fournisseur :

#### a. Nettoyage des membranes céramiques

On réalise un premier lavage par passage d'une solution alcaline (soude à 1,5 % à 80°C). La solution circule tout d'abord 5 minutes sans pression puis 20 minutes avec une pression de 1 bar. L'objectif de ce nettoyage est la dégradation de la matière organique. L'installation et la membrane sont ensuite rincées à l'eau jusqu'à la neutralité du filtrat.

Un second lavage est réalisé par filtration d'une solution acide (acide nitrique à 1,5 % à 60°C) dans les conditions similaires à celles du nettoyage basique. Ce second nettoyage permet de dissoudre les composés minéraux.

Après le rinçage à l'eau, les membranes sont soit conservées à 4°C dans de l'eau osmosée en présence d'azide de sodium 0,02 % jusqu'à leur prochaine utilisation ou soit séchées.

b. Nettoyage des membranes organiques en spirale.

Le nettoyage des membranes organiques est plus délicat. Selon leur composition, les membranes présentent des résistances aux solutions basiques et acides différentes. La température limite d'utilisation varie également en fonction de la membrane. En ce qui concerne les membranes organiques utilisées dans le cadre de cette étude, celles-ci sont soit jetées après usage (cas des membranes utilisées lors des essais en filtration frontale), soit lavées en suivant les recommandations du fournisseur. Pour le nettoyage des membranes spirales, la procédure ci-dessous a été suivie :

- Filtration de 8 à 10 L d'eau osmosée (filtration sans recyclage,  $4 \text{ L.min}^{-1}$ , 2 bar, 30 min).
- Lavage avec une solution de NaOH 0,1N (filtration avec recyclage,  $4 \text{ L.min}^{-1}$ ,  $50^{\circ}\text{C}$ , 60 min).
- Rinçage à l'eau jusqu'à pH=7 (filtration sans recyclage,  $4 \text{ L.min}^{-1}$ , 2 bar, 30 min).
- Lavage avec une solution  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0.1N (filtration avec recyclage,  $4 \text{ L.min}^{-1}$ ,  $50^{\circ}\text{C}$ , 30 min).
- Rinçage à l'eau jusqu'à pH=7 (filtration sans recyclage,  $4 \text{ L.min}^{-1}$ , 2 bar, 30 min).

Les membranes ainsi lavées sont stockées dans une solution de NaOH 0,1N à  $4^{\circ}\text{C}$  jusqu'à une nouvelle utilisation.

Quel que soit le type de membranes lavées, à la fin de la procédure de nettoyage, on effectue une mesure de la perméabilité à l'eau pour vérifier l'efficacité du lavage. Une récupération de flux inférieure à 80% de la perméabilité initiale de la membrane signifie que le nettoyage est insuffisant et qu'il est nécessaire de procéder à un nouveau lavage de la membrane.



## **CHAPITRE 3 RESULTATS ET DISCUSSION**

### **I. CARACTERISATION DE LA MATIERE PREMIERE : AGUAMIEL**

Les données de la littérature sur la composition des jus d'agave de type aguamiel étant parcellaires et peu nombreuses, (Cravioto *et al.* 1945; Sánchez-Marroquín et Hope 1953; Granados-Sánchez 1993), nous avons donc réalisé une caractérisation approfondie de cette matière première. Nous avons également souhaité vérifier que cette composition n'évolue pas au cours de la période de production ce qui serait problématique pour une production industrielle standardisée. Par conséquent, des échantillons d'aguamiel provenant de différentes plantes prises au sein d'un même site de production ont été collectés en vue d'être analysés, à différentes dates au cours de la période de production.

L'agave pulquéro sélectionnée ici est la variété *A. mapisaga*, utilisée pour la production d'aguamiel dans le village de Lomas de Romero, dans l'état de Puebla, une des principale région productrice de pulque au Mexique. Le village de Lomas de Romero a été choisi pour la récolte des échantillons en raison de sa proximité (30 km) avec l'Université Technologique de Tecamachalco (UTT), ceci afin de faciliter le prélèvement périodique des échantillons.

Le premier prélèvement a été réalisé 15 jours après le démarrage de la production (1<sup>er</sup> juin 2005), alors que les agaves de la plantation avaient atteint leur pleine maturité et s'apprêtaient à fleurir. Les dates des autres prélèvements prévues pour s'échelonner tout au long de la période de production ont été conditionnées par les conditions climatiques. Aucun prélèvement n'a été réalisé sous la pluie et après une période de pluie, une attente de deux jours a été respectée avant d'effectuer un nouveau prélèvement. C'est pourquoi, les dates des prélèvements réalisés sont respectivement 0,5 ; 1,0 ; 2,3 ; 2,5 et 4,5 mois après le 1<sup>er</sup> jour de production n'ont pas tout à fait respecté le planning de prélèvement prévu initialement.

Les résultats des analyses réalisées sont présentés ci-après.

## A. ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES D' AGUAMIEL

L'évolution des principales caractéristiques physico-chimiques de l'aguamiel produit par 3 plantes à différents temps de production est présenté sur la Figure 18. D'après les résultats obtenus, aucun effet significatif du temps sur l'acidité titrable n'est observé ( $p < 0,0846$ ). Cependant, ce facteur décroît légèrement dans les échantillons collectés après trois mois de récolte. Les valeurs du pH restent constantes et voisines de 4,5 dans tous les échantillons d'aguamiel collectés au cours de l'étude (A).

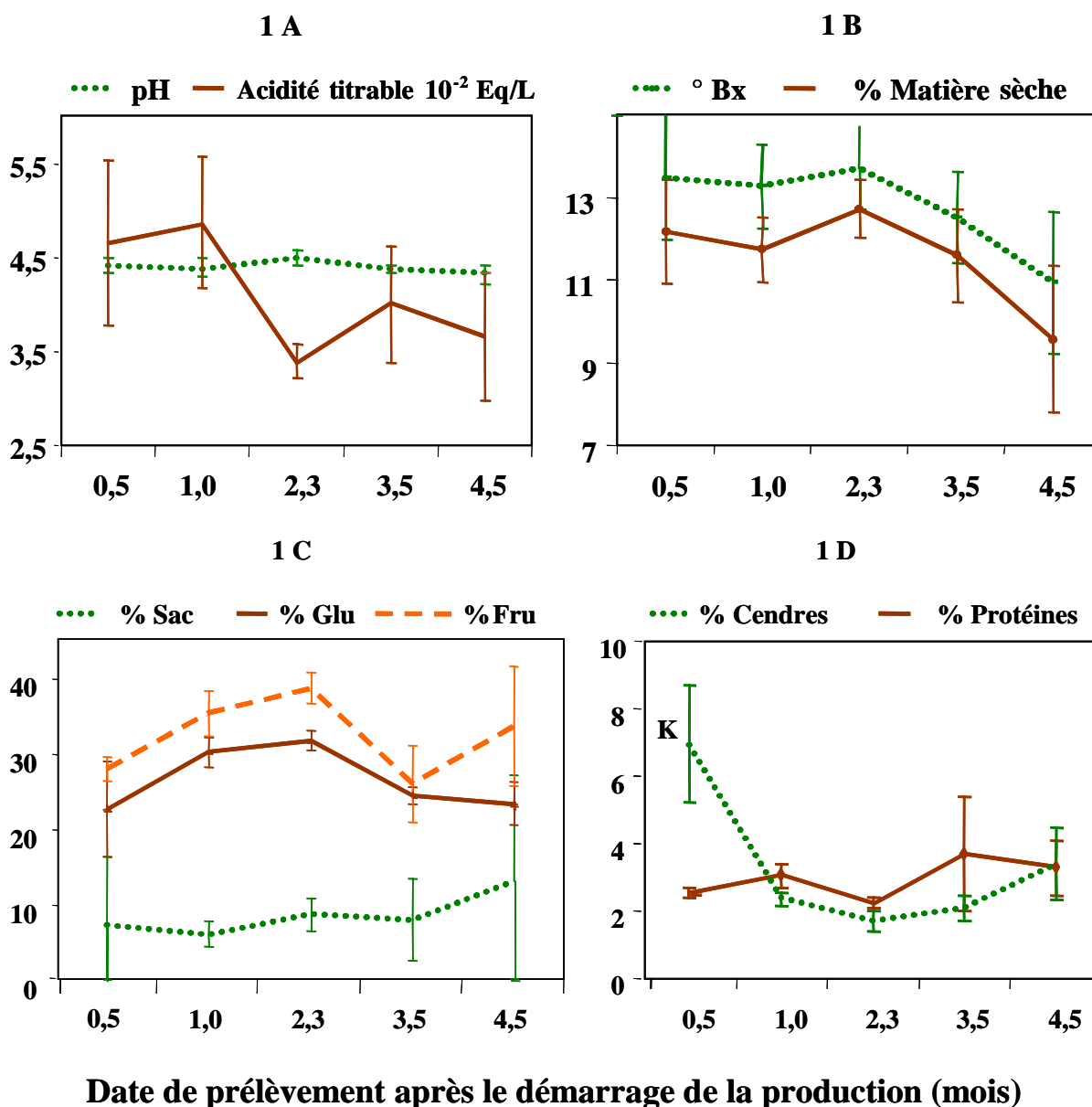


Figure 18 : Évolution des caractéristiques physico-chimiques de l'aguamiel d'*A. mapisaga* au cours de la période de production. 1 A: pH et acidité titrable, 1 B: °Bx et matière sèche, 1 C et 1D : concentrations exprimées en % (P/P) par rapport à la matière sèche Sac= saccharose; Glu= glucose; Fru= fructose, cendres et protéines.

La teneur en matière sèche ne change pas significativement ( $p < 0,0699$ ) et représente en moyenne 11,5 % du poids total de l'aguamiel récolté. Par ailleurs, on constate qu'il existe une bonne corrélation entre la teneur en matière sèche et les concentrations en sucres solubles totaux (Figure 18B), ceci indique que la majorité de la matière sèche est associée aux mono et disaccharides. En effet, la somme du glucose, fructose et saccharose représente plus de 65 % du poids total de la matière sèche, la concentration en saccharose étant toujours significativement plus faible que celles des deux monosaccharides (Figure 18C). On ne note pas d'évolution majeure des concentrations de ces 3 sucres au cours du temps mis à part une chute significative ( $p < 0,0314$ ) de la concentration en fructose dans les échantillons collectés 3,5 mois après le début de la récolte.

Si la concentration en protéines reste constante ( $p < 0,3368$ ) et voisine de 3 % du poids total de matière sèche tout au long de la période de récolte, ce n'est pas le cas de la concentration en cendres. Le pourcentage des cendres présente une diminution significative au cours des deux premiers mois de récolte ( $p < 0,003$ ) (Figure 18D). Cette décroissance est principalement due à la décroissance significative ( $p < 0,0011$ ) de la concentration en potassium (K). En effet, la concentration en K varie de  $1614 \pm 22$  à  $960 \pm 8 \text{ mg.L}^{-1}$  durant cette période. La teneur en cendres se stabilise dans les échantillons d'aguamiel collectés au delà des 3 premiers mois de production. Cette stabilité de la concentration en cendres est associée à une augmentation légère du calcium (de  $35 \pm 1$  à  $126 \pm 36 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Rendiles *et al.*, ont rapporté un comportement similaire de la teneur en potassium dans la sève du goyavier *Psidium guajava L.* et d'autres arbres fruitiers. Ils attribuent la décroissance initiale du K à la formation foliaire ainsi qu'à la formation du fruit et plus tard, la croissance en K et en Ca au début d'une nouvelle phase de croissance de la plante (Rendiles *et al.* 2004). En effet le potassium joue un rôle vital dans une large part des processus biochimiques et biophysiques de la plante. C'est un transporteur de charges très mobile capable de neutraliser les effets de charge des anions. Il joue également un rôle important dans l'activation de systèmes enzymatiques ainsi que dans le transport membranaire. Aucune différence significative n'a été observée dans les concentrations en sodium et magnésium tout au long de la période de production. Les concentrations de ces éléments sont restées respectivement égales à  $116 \pm 25$  et  $72 \pm 9 \text{ mg.L}^{-1}$ . Les cendres contiennent également des traces de Fer ( $1,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ), de Zinc ( $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ ), Cuivre ( $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$ ) et manganèse ( $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Bien que la présence d'acide ascorbique ait été rapportée dans l'aguamiel (Cravioto *et al.* 1945; Granados-Sánchez 1993), ce composé n'a pu être mis en évidence dans nos échantillons en raison vraisemblablement de

sa dégradation au cours du transport, et/ou de son stockage (congélation/décongélation multiples). Aucune précaution n'a en effet été prise vis à vis des phénomènes oxydatifs.

## B. IDENTIFICATION ET QUANTIFICATION DES ACIDES AMINES

Les concentrations en acides aminés (AA) libres dans les différents échantillons d'aguamiel au cours de la période de production sont rapportées sur la Figure 19. A partir de ces analyses, la quantité d'AA libres a été estimée à  $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ . Il est intéressant de préciser que tous les AA essentiels sont présents dans l'aguamiel à l'exception de la méthionine dont on observe la présence à un très faible pourcentage (moins de 0,01% de la matière sèche) uniquement dans l'échantillon collecté 4,5 mois après le début de la production.

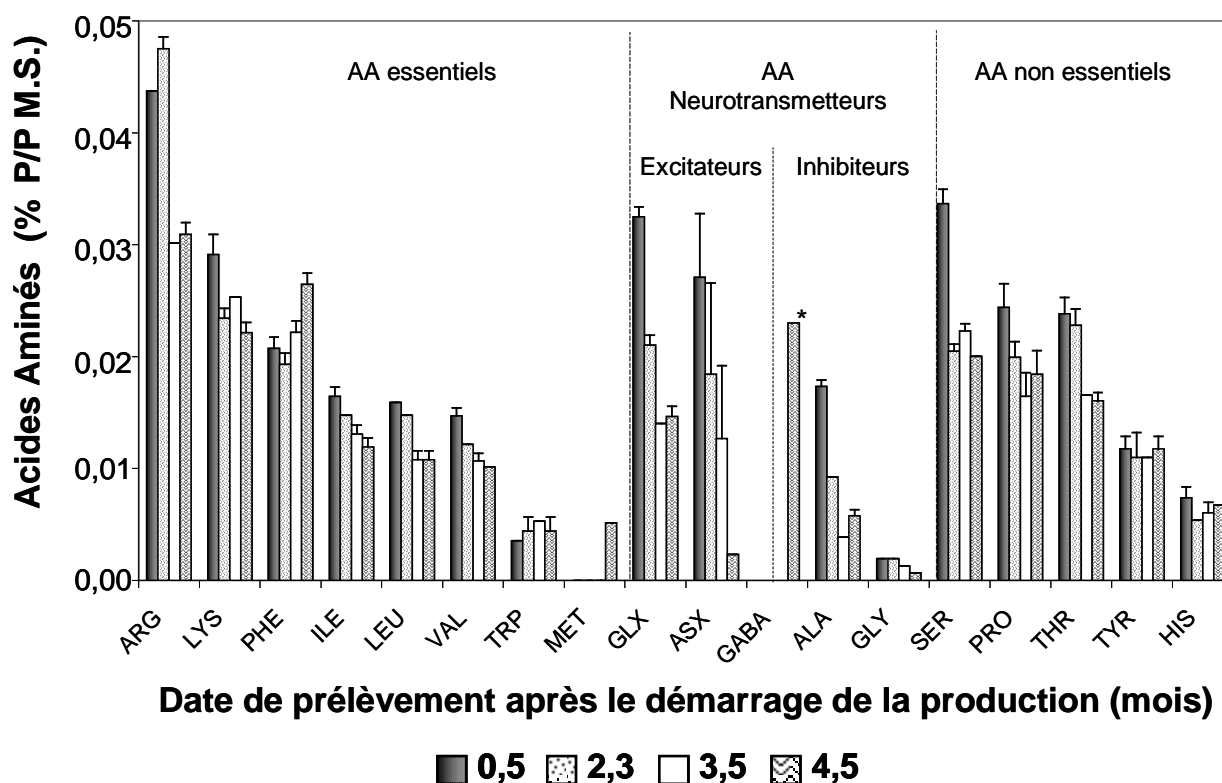


Figure 19 : Concentration des différents acides aminés libres dans l'aguamiel d'*A. mapisaga* au cours de la période de production. \*GABA (acide  $\gamma$ -amino-butirique n'a été quantifié que dans le dernier échantillon obtenu).

En ce qui concerne la composition en AA libres, aucune différence significative n'a été observée au cours de la période de production à l'exception des concentrations en arginine (ARG), acide aspartique/asparagine (ASX) et alanine (ALA) qui ont diminué de façon continue entre le premier et le dernier prélèvement.

La disparition de ces AA de l'aguamiel s'explique facilement par le fait qu'il s'agit d'AA impliqués dans les différentes voies du métabolisme de la plante. En effet l'alanine se transforme par simple transamination en  $\alpha$ -keto pyruvate, un composé à l'intersection de différentes voies métaboliques. En présence d'une quantité suffisante d'oxygène, ce composé est converti en acétyl-coenzyme A, intermédiaire principal du cycle de Krebs mais si l'oxygène manque, le pyruvate est converti en lactate. De la même façon, l'acide aspartique est un analogue de l'oxaloacetate qui est aussi un intermédiaire du cycle de Krebs. En ce qui concerne l'arginine, cet AA est un précurseur des polyamines qui sont de petits régulateurs de croissance polycationiques impliqués dans un très grand nombre de processus de développement et de croissance des plantes (Bouchereau *et al.* 1994).

A coté de ces AA très connus, un pic inconnu a été identifié dans nos chromatogrammes comme étant de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA). Cet AA n'est jamais rencontré dans la structure des protéines mais il est très largement répandu dans le règne végétal même si sa concentration est généralement faible variant de 0,03 à 2,00  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  de matière fraîche (Shelp *et al.* 1999). Dans nos échantillons, la concentration en GABA est estimée à 0,25  $\mu\text{mol.mL}^{-1}$  soit 26  $\text{mg.L}^{-1}$  d'aguamiel. La synthèse de GABA est généralement induite par différents stress incluant le froid, la chaleur de même que la pluie, le vent etc... Il n'est donc pas étonnant que ce composé se retrouve dans l'aguamiel, un jus issu de plantes soumises à des conditions climatiques contrastées.

L'acide  $\gamma$ -aminobutyrique est connu comme étant le principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux sympathique. Il joue également un rôle sur le système cardiovasculaire. Inoue *et al.* (2003), ont rapporté que la consommation de seulement 10  $\text{mg.j}^{-1}$  de GABA pendant 12 semaines a un effet positif sur la réduction de la pression sanguine de patients hypertendus alors qu'elle ne produit aucun effet chez les patients dont la pression est normale (Inoue *et al.* 2003). Toutefois, même si l'aguamiel peut être considéré comme une boisson « fonctionnelle » c'est-à-dire bénéfique à la santé, sa concentration en GABA, de l'ordre de 26  $\text{mg.L}^{-1}$ , est trop faible pour qu'il soit économiquement rentable d'utiliser ce jus comme matière première pour un procédé de purification de GABA.

## C. CARACTERISATION DES FRUCTANES DE L'AGUAMIEL

La teneur en sucres de nos échantillons d'aguamiel varie de 5 à 18 g.L<sup>-1</sup> et le DP moyen des fructanes calculé à l'aide de l'équation 2,4 (cf § chapitre 2.II.D.1) est de l'ordre de 4. Or Martinez del Campo Padilla (1999) a rapporté la présence de 8 à 17 g.L<sup>-1</sup> de FOS et d'inulines de DP compris entre 4 et 31 dans l'aguamiel d'*Agave atrovirens*, une espèce d'agave pulquéro proche de celle utilisée ici. Il nous a donc paru indispensable de mettre en œuvre des méthodes d'analyses plus spécifiques pour caractériser la fraction glucidique de notre aguamiel.

### 1. Distribution des Mw des polysaccharides présents dans l'aguamiel

La chromatographie d'exclusion stérique permet d'obtenir le profil de distribution en masses molaires des polysaccharides. Un échantillon d'aguamiel et d'inuline de chicorée du commerce (*Chicorium intybus*) sont injectés successivement sur 2 colonnes d'exclusion stérique Shodex et les profils chromatographiques obtenus sont présentés Figure 20. Afin d'estimer la masse molaire des polysaccharides présents, les colonnes sont préalablement calibrées avec des standards de pullulanes de masses molaires connues (chapitre 2.II.C.2)

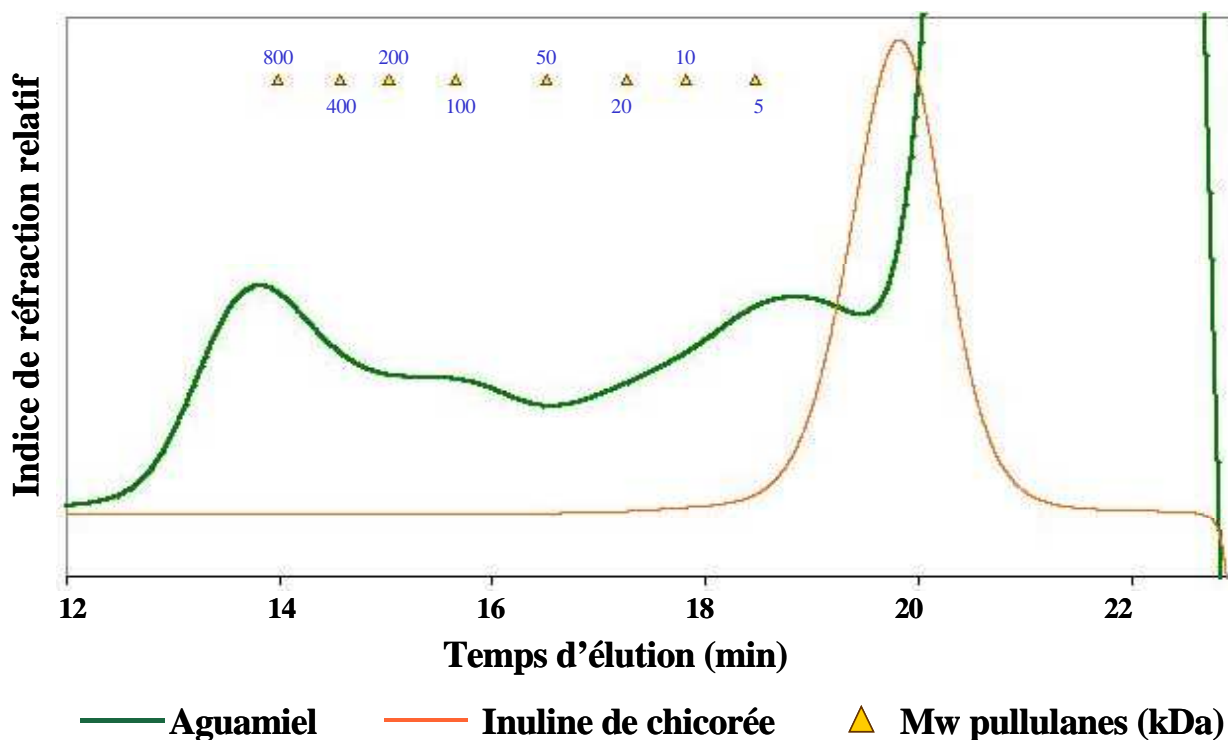


Figure 20 : Profils obtenus par chromatographie d'exclusion stérique sur colonne Shodex des macromolécules isolées à partir d'Aguamiel et de l'Inuline de chicorée.

On constate que les macromolécules solubles de l'aguamiel se distribuent de façon hétérogène sur tout le chromatogramme mais on peut mettre en évidence trois pics majoritaires. Le premier pic est élué entre 13 et 14,8 min et correspond au volume d'exclusion des colonnes Shodex soit une masse molaire moyenne de 804 kDa, (calculé à l'aide de l'équation 2,3, cf chapitre 2.II.C.2). Le deuxième pic est élué entre 14,8 et 16,5 min ( $M_w = 114$  kDa), tandis que le troisième est élué entre 16,5 et 19,5 min avec un maximum à 18,9 min soit une  $M_w$  moyenne de 3,7 kDa.

Le profil d'élution de l'inuline de chicorée du commerce est plus simple et ne met en évidence qu'un seul pic élué à 19,82 min. Cette inuline présente une masse molaire moyenne de 1,4 kDa, ce qui correspond à un DP moyen de 8,5.

Sur la base de ce profil, l'aguamiel semble contenir des fructanes de très haut poids moléculaire. Or d'après la littérature, les fructanes végétaux ont un DP maximum d'environ 60 à 80, ce qui correspond à une masse molaire maximum théorique de l'ordre de 13 kDa (Roberfroid 2005; Van De Wiele *et al.* 2007). Par conséquent il est vraisemblable que la fraction de haut poids moléculaire mise en évidence ici ne correspond pas à un pic de fructanes. Pour vérifier cette hypothèse et identifier la nature des différentes familles de polysaccharides présents, nous avons entrepris une pré-purification des macromolécules d'aguamiel sur une autre colonne d'exclusion stérique à savoir une colonne Superdex 30 dont le domaine de fractionnement est inférieur à 10 kDa.

## 2. Fractionnement des fructanes sur colonne de Superdex 30

Les macromolécules d'un jus d'Aguamiel sont injectées sur une colonne Superdex 30, le profil d'élution est présenté dans la Figure 21. La présence de sucres est mise en évidence par des tests au phénol sulfurique. Ainsi, 4 fractions développant une coloration caractéristique de la présence de sucres, sont collectées et leur composition glucidique déterminée.

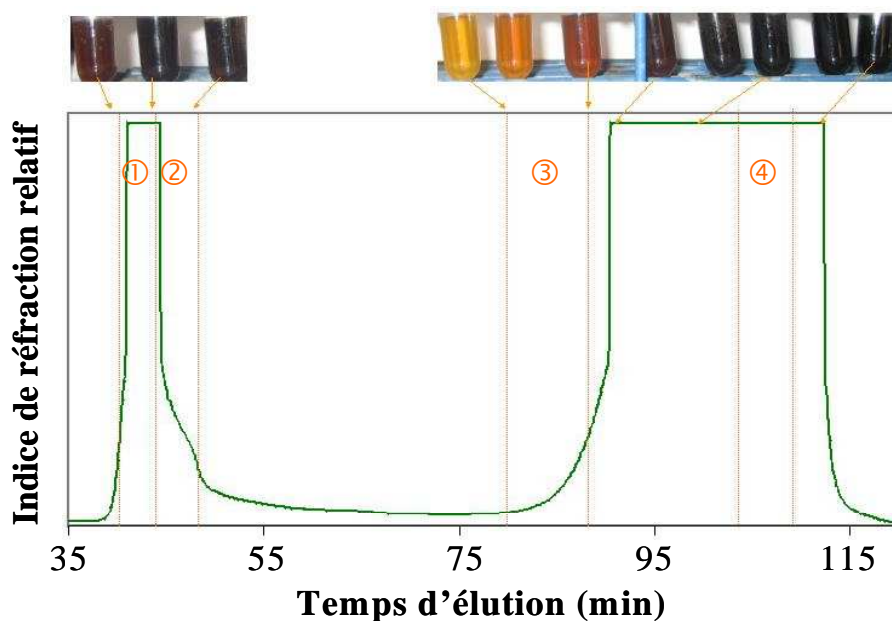


Figure 21 : Séparation des polysaccharides du jus d'aguamiel par chromatographie d'exclusion stérique sur colonne Superdex 30.

a. Analyse de composition

Les quatre fractions obtenues sur Superdex 30 ont été lyophilisées et soumises à une analyse de composition selon le protocole décrit au chapitre 2.II.C.4. Les sucres identifiés dans chacune des fractions sont exprimés en % molaire et sont présentés dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Composition en % molaire des quatre fractions polysaccharidiques obtenues par chromatographie sur Superdex 30

Fraction	% Molaire			
	1	2	3	4
<b>Arabinose</b>	1	0,8	0,4	0,2
<b>Mannose</b>	1,3	2,7	3,6	23,8
<b>Glucose</b>	97,7	96,5	96	76

Ces résultats montrent que les deux premières fractions (pics 1 et 2) sont composées à plus de 95% par du glucose tandis que la fraction 4 est composée de 24 % de mannose et de 76 % de glucose. La présence de mannose résulte vraisemblablement de la dégradation des résidus de fructose. En effet, lors de l'étape de réduction après l'hydrolyse acide des échantillons, la fonction cétonique du fructose est réduite en proportion égale en mannitol et glucitol (Figure 22).



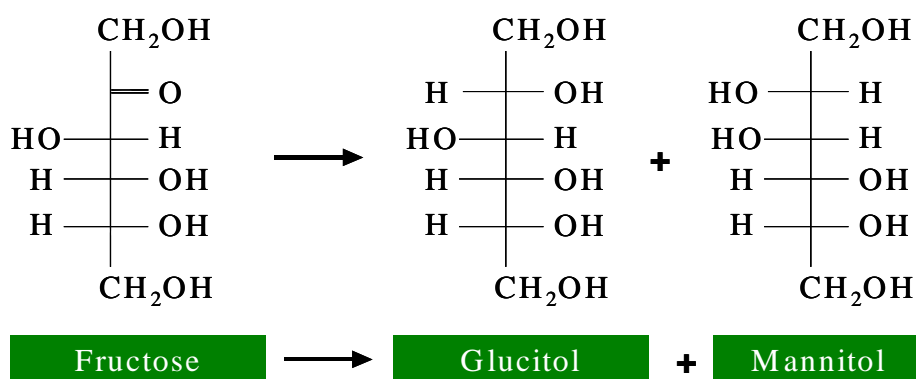


Figure 22 : Réduction du fructose en glucitol et mannitol

Par conséquent, l'identification de mannose dans la composition glucidique de la fraction 4 suggère la présence dans cette fraction de fructose libre, mais également de saccharose et de structures de type fructanes en raison de la présence de glucose. Toutefois l'excès de glucose dosé (+50%) par rapport au mannose montre qu'il y a également présence de composés glucidiques riches en glucose.

Afin d'identifier la nature des structures polysaccharidiques présentes dans la fraction 1, 10  $\mu\text{l}$  d'amyloglucosidase (solution à 24 unités diluée 50 fois) ont été ajoutés à 1mg de la fraction 1 dilué dans 250  $\mu\text{l}$  de tampon acétate 50mM pH 4,8. Le mélange est incubé pendant 18 heures à 50°C. Après injection du mélange incubé, on observe une diminution de 50% de la hauteur du pic de haut poids moléculaire parallèlement à une augmentation du pic de faible poids moléculaire. Ce résultat confirme la présence d'un polymère de type amidon dans l'aguamiel avec un poids moléculaire apparent élevé.

#### b. Analyse de structure

La réaction de méthylation permet de déterminer l'enchaînement des monosaccharides entre eux, et ainsi d'obtenir les liaisons glycosidiques de chaque sucre au sein du polysaccharide natif. Nous avons utilisé l'inuline de chicorée et de l'agavine (poudre FRUCTAGAVE - PR-95) pour réaliser nos témoins de méthylation. Les analyses de structure ont été réalisées sur les fractions 1 et 3. En effet, même si la fraction 4 est la plus riche en fructose, il est probable, compte tenu de la spécificité de la chromatographie réalisée (séparation sur la base du poids moléculaire), que cette fraction contienne essentiellement des FOS de faible DP et du saccharose en plus du fructose et du glucose libres. Les résidus

mannose présents dans la fraction 3 proviennent plus sûrement de structures de type fructanes. Les résultats d'analyse de structure sont présentés dans le Tableau 13.

L'inuline de Chicorée est un fructane linéaire avec des liaisons  $\beta(2\rightarrow1)$  entre les unités de fructose et le glucose (constitutif de la molécule initial de saccharose) est en position terminale. Dans le Tableau 13, le fructose lié en  $\beta(2\rightarrow1)$  est présent sous la forme de 3,4,6-Glc et de 3,4,6-Man et le glucose terminal est identifié sous la forme de 2,3,4,6-Glc. Après méthylation et hydrolyse acide pendant l'étape de réduction, les éthers méthyliques du fructose vont être réduits en proportion égale en éthers partiellement méthylés acétylés de mannose et de glucose.

**Tableau 13 : Analyse des liaisons glycosidiques des fractions polysaccharidiques ( 1 et 3 ) isolées sur Séphadex 30 à partir de l'aguamiel et ainsi que celles de témoins agavine \* (FRUCTAGAVE PR-95) et d'inuline \*\* de chicorée.**

Ether glycosidique	Liaison	% Molaire			
		Aguamiel F1	Aguamiel F3	Agavine*	Inuline**
2346 Glucose	Term Glcp	19,3	12,1	15,3	17,1
234 Glucose	1 $\rightarrow$ 6	50,4	-	18,6	-
346 Glucose	$\rightarrow$ 2)Fruc(1 $\rightarrow$	6,6	5,1	12,5	45,2
236 Glucose	1 $\rightarrow$ 4	6,4	16,3	-	-
24 Glucose	1 $\rightarrow$ 3,6	-	7,3	-	-
23 Glucose	1 $\rightarrow$ 2,6	-	5	-	-
134 Glucose	$\rightarrow$ 2)Fruc(6 $\rightarrow$	1,6	-	12,4	7
34 Glucose	$\rightarrow$ 2)Fruc(1,6 $\rightarrow$	3,5	-	5,8	-
346 Mannose	$\rightarrow$ 2)Fruc(1 $\rightarrow$	11,8	7,4	18,1	27,6
34 Mannose	$\rightarrow$ 2)Fruc(1,6 $\rightarrow$	-	-	3,9	-
234 Mannose	1 $\rightarrow$ 6	-	45,5	-	-
134 Mannose	$\rightarrow$ 2)Fruc(6 $\rightarrow$	1,9	-	13,3	3

Les fructanes de type agavine sont constitués par des chaînes de fructose liées en  $\beta(2\rightarrow6)$  attachées au résidu fructose du saccharose, et par des chaînes de fructose liées en des liaisons  $\beta(2\rightarrow1)$ . Les liaisons entre les résidus fructoses sont donc de type  $\beta(2\rightarrow1)$  et/ou  $\beta(2\rightarrow6)$ . Ces fructanes possèdent de nombreux branchements, notamment du fait de la présence de résidu de glucose interne. Les fructoses en  $\beta(2\rightarrow6)$  sont caractérisés par les éthers suivants 1,3,4-Glc et 1,3,4-Man, les chaînes de fructose lié en  $\beta(2\rightarrow1)$  sont identifiés dans le tableau par le 3,4,6-Glc et le 3,4,6-Man (12,5 et 13,5 respectivement). Le 3,4-Glc et le 3,4-

Man (5,8 et 3,9 % respectivement) représentent le fructose de branchement des deux chaînes de fructose en  $\beta(2\rightarrow1)$  et  $\beta(2\rightarrow6)$ . La présence de 2,3,4-Glc dans l'analyse de méthylation de l'agavine indique bien la présence du résidu de glucose interne substitué en 6 par une chaîne de fructose comme décrit par Mancilla-Margalli et Lopez 2006.

Dans le Tableau 13 est aussi reporté l'analyse des liaisons glycosidiques des fractions polysaccharidiques isolées à partir de l'aguamiel. Par comparaison, nous pouvons identifier la présence de 2,3,4,6-Glc, de 3,4,6-Glc et de 3,4,6-Man, qui semble indiquer la présence de structure de type inuline dans l'aguamiel. On identifie aussi en très faible quantité les éthers suivants 1,3,4-Glc et 1,3,4-Man (1,6 et 1,9 % respectivement), caractéristiques des chaînes de fructose en  $\beta(2\rightarrow6)$  présent dans les agavines. Ceci indique que dans le jus d'aguamiel, il y a des fructanes de type inuline et en plus faible concentration des fructanes de type agavine mais les fractions polysaccharidiques n'ayant pas été purifiées, il est difficile d'obtenir la structure précise des agavines présents dans le jus d'aguamiel. L'objectif du travail étant de mettre au point un procédé membranaire pour enrichir en composés d'intérêt de l'aguamiel, nous avons décidé de ne pas fractionner et purifier les polysaccharides et de ne pas caractériser de manière fine les structures des fructanes présents dans ce jus.

### 3. Vérification de la présence de fructanes.

La présence de fructanes a été mise en évidence par l'analyse de composition mais elle a également été confirmée de façon indirecte par la mise en oeuvre d'une inulinase isolée à partir d'*Aspergillus niger* (Fructozyme L Novozymes). 10  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  d'inulinase ont été ajoutés à de l'aguamiel dilué 10 fois dans un tampon acétate 100 mM (pH 4,7). Le mélange est incubé à 50°C pendant 12h sous agitation puis porté à ébullition pendant 10 min afin de stopper les réactions enzymatiques. Une aliquote de cette solution a été prélevée en vue d'analyses puis le reste de la solution a été soumis à une nouvelle hydrolyse par l'ajout de 10  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  d'amyloglucosidase. Le mélange a été maintenu à 50°C sous agitation pendant 12 nouvelles heures. La réaction est de nouveau stoppée par chauffage à 100°C pendant 10 min et une nouvelle aliquote de la solution est prélevée pour analyses. La présence des fructanes a été déterminée qualitativement par chromatographie liquide d'échange d'anions haute performance (CLEAHP) selon le mode opératoire décrit au chapitre 2.II.C.3.a.

Les profils de chromatographie ionique obtenus avant et après hydrolyse par l'inulinase et l'amyloglucosidase sont présentés Figure 23.

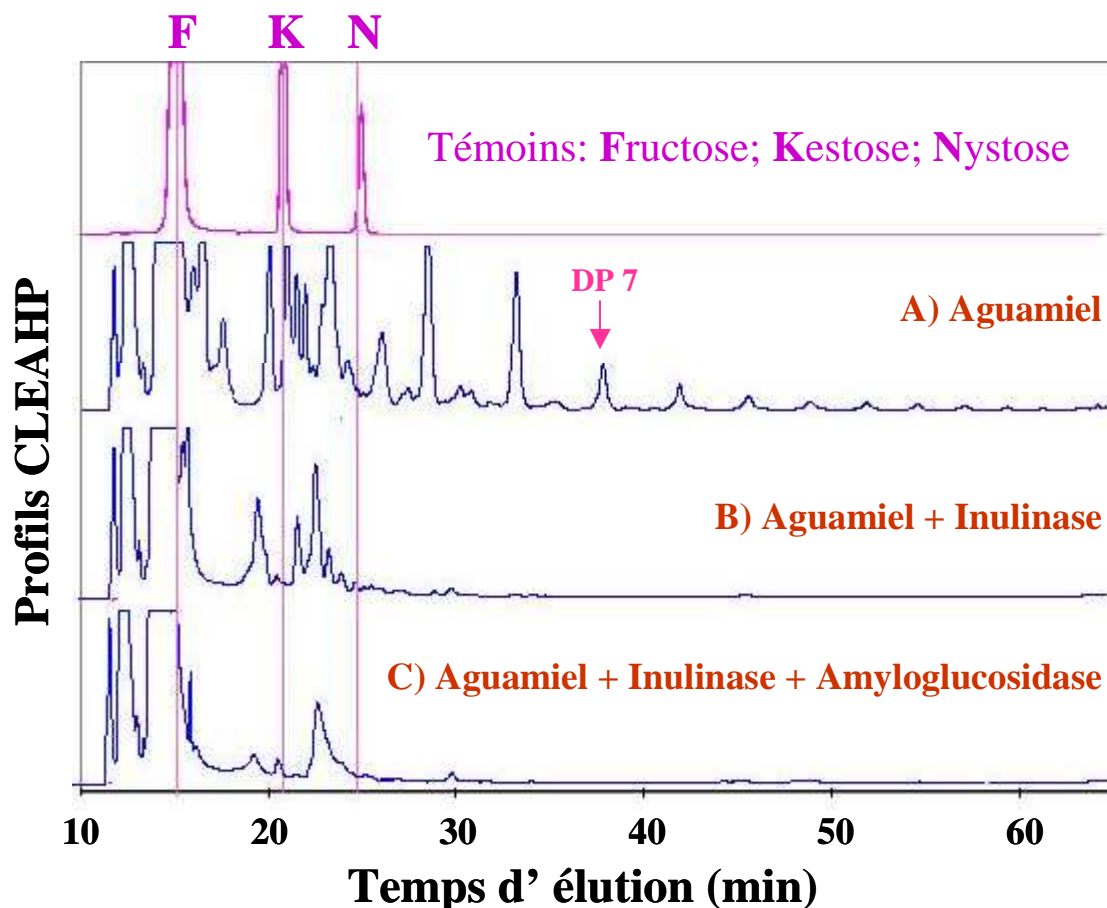


Figure 23 : Profils CLEAHP avec une détection ampérométrique pulsée de l'aguamiel d'*A. pulquéro* sur système Dionex avant et après hydrolyse enzymatique par de l'inulinase et par de l'inulinase + de l'amyloglucosidase. La colonne est calibrée avec des standards, F= Fructose; K= Kestose; N= Nystose.

Le profil CLEAHP de l'aguamiel non hydrolysé (Figure 23A) met en évidence la présence de plusieurs pics qui disparaissent lors de l'ajout d'inulinase (Figure 23B). La présence dans l'aguamiel de fructanes de type inuline est donc confirmée. De plus, on peut affirmer que presque tous les pic élués après 25 min sont des fructanes puisqu'ils disparaissent pratiquement tous lors de l'ajout d'inulinase. Après ajout de l'amyloglucosidase, une nouvelle dégradation de pics est visible (Figure 23C). Cela confirme la présence de gluco-oligosacharides. Les pics toujours visibles après les deux étapes d'hydrolyse (Figure 23C) peuvent correspondre à des fructanes fortement branchés impliquant des résidus  $\beta$ -fructofuranosyl reliés par des liaisons  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 2) et  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 6), décrits dans la littérature sous l'appellation d'agavines et dont la présence a été rapportée dans plusieurs espèces d'agave (López *et al.* 2003; Mancilla-Margalli et Lopez 2006; Waleckx *et al.* 2008).

#### 4. Polydispersité des fructanes

Afin d'étudier une éventuelle évolution dans la composition en fructanes au cours de la période de production, les profils CLEAHP des différents échantillons d'aguamiel sont comparés dans la Figure 24.

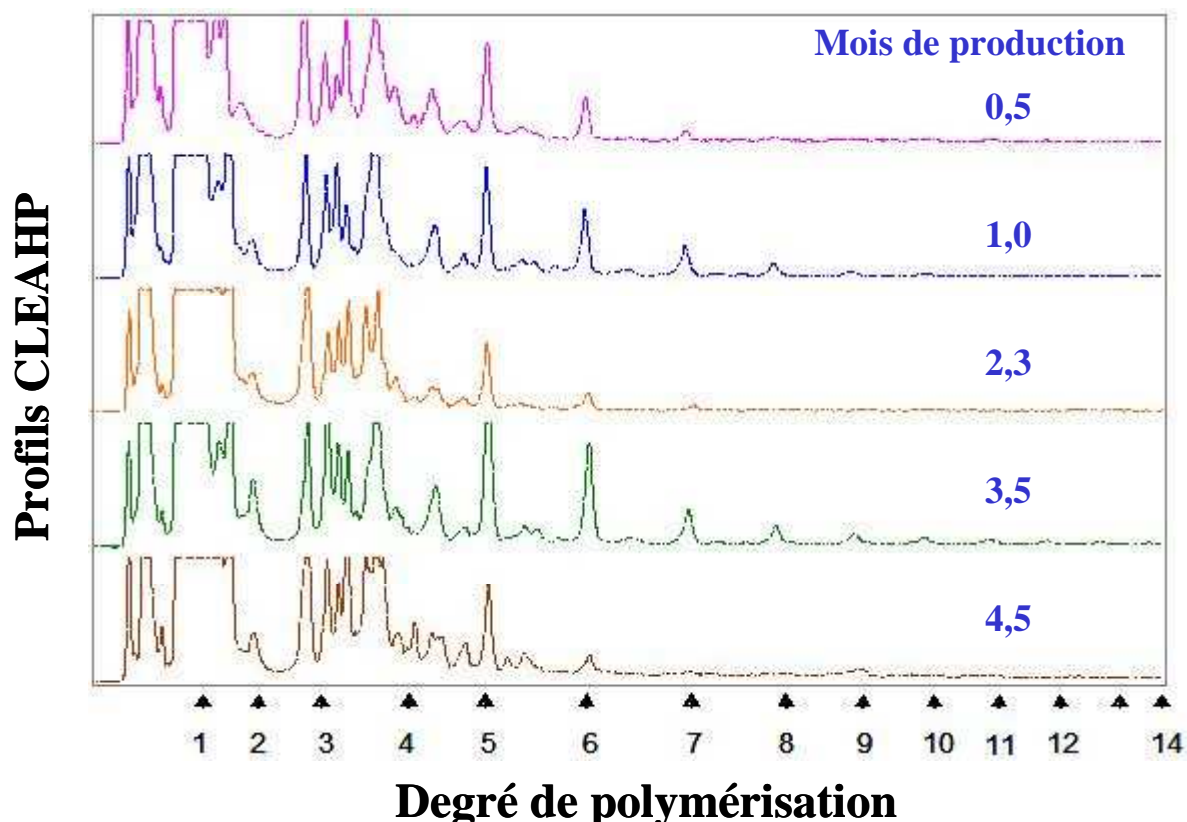


Figure 24 : Profils CLEAHP avec une détection ampérométrique pulsée de l'aguamiel *A. pulquéro* en fonction de la date de collecte.

Les profils indiquent que l'aguamiel d'*A. pulquéro* renferme majoritairement des FOS dont le DP est faible (de 3 à 6) ainsi que de faibles quantités de FOS de DP compris entre 7 et 10. Aucun pic significatif correspondant à des DP supérieurs à 10 n'a été mis en évidence. Si l'on compare les échantillons entre eux, il n'est pas possible de mettre en évidence des différences significatives. La date de récolte ne semble pas influencer sur la polydispersité des fructanes. Toutefois, le profil obtenu avec l'échantillon collecté 3,5 mois après le début de la production laisse deviner des traces de fructanes de DP plus élevé. Ce résultat est à mettre en relation avec les observations faites lors de l'analyse des sucres. La concentration en fructose de cet échantillon était significativement plus faible.

A la vue de ces résultats, il apparaît que l'aguamiel d'*A. mapisaga*, que nous avons étudié ne renferme pratiquement pas d'inuline. Or des travaux précédents ont rapporté la présence d'inuline dans l'aguamiel d'*A. atrovirens*, une variété proche de l'*A. mapisaga* (Martinez Del Campo Padilla 1999). L'absence d'inuline pourrait être due à une hydrolyse de ces structures lors de la collecte ou avant le stockage à -18°C de ces échantillons. En effet la présence dans l'aguamiel d'une souche de *Kluyveromyces sp* hyperproductive d'inulase a été rapportée par (Cruz-Guerrero *et al.* 2006). La présence de ce type d'enzyme dans nos échantillons expliquerait ainsi pourquoi on n'y retrouve pratiquement pas d'inuline mis à part l'échantillon collecté après 3,5 mois pour lequel les conditions de collecte auraient pu être moins favorables à l'hydrolyse.

Pour confirmer cette hypothèse, la recherche d'enzymes endogènes a été réalisée en suivant le protocole décrit dans le chapitre 2.II.D.2. De l'aguamiel a donc été ajouté à une solution d'inuline de chicorée, une première aliquote de cette solution a été immédiatement chauffée à 100 °C pour inactiver les éventuelles enzymes correspondant à un « blanc » (A). Une deuxième aliquote correspondant à un « témoin » (B) a été chauffée dès l'addition de l'enzyme puis incubée 110h à 50°C, le reste de la solution n'a été chauffée qu'après 110h d'incubation à 50°C « Test » (C). Les profils CLEAHP de ces 3 solutions sont comparés sur la Figure 25.

Tout d'abord on constate que les profils CLEAHP du blanc (Figure 25A) et du témoin (Figure 25B) sont similaires. L'incubation à 50°C pendant 110h n'a eu aucune incidence sur la composition de l'échantillon. Les enzymes éventuellement présentes ont donc bien été inactivées par le chauffage initial de la solution. Par contre si l'on s'intéresse au profil CLEAHP du test (Figure 25C), on constate d'importants changements. L'importance des pics de fructanes a été réduite alors que les pics correspondant aux monosaccharides sont augmentés. Ces résultats confirment que les fructanes de haut DP (inuline) ont été hydrolysés par les enzymes présentes dans l'aguamiel. Cette hydrolyse a été confirmée par des analyses de sucre à l'aide du kit enzymatique Boehringer. On constate que la composition en sucre du blanc et du témoin sont équivalentes. Par contre les concentrations en fructose et glucose du test sont respectivement augmentées de 33 et 20% tandis que celle du saccharose a été diminuée de 4,5%. Ce dernier résultat confirme la présence d'inulinase et d'invertase dans nos échantillons d'aguamiel. Ces enzymes toujours actives après plus de 5 mois de stockage à

-18°C peuvent provenir de la plante elle-même mais peuvent également avoir été sécrétées par les micro-organismes présents dans l'aguamiel avant l'addition de  $\text{NaN}_3$ .

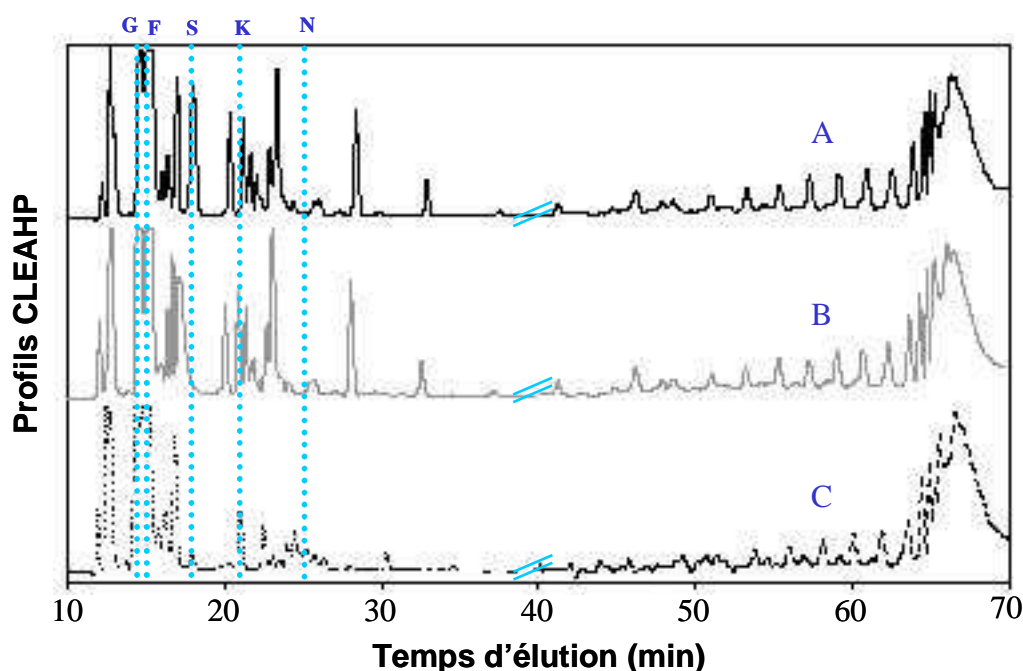


Figure 25 : Profils CLEAHP d'une solution d'inuline de chicorée préparée dans de l'aguamiel d'A. pulquéro. A): "blanc", B) : "témoin", C) : "Test". La réponse relative du détecteur a été amplifiée 10 fois après 40 min d'élution. (G= Glucose; F= Fructose; S= Saccharose; K= Kestose; N= Nystose).

En raison de ces hydrolyses non contrôlées, le contenu polysaccharidique de nos échantillons d'aguamiel est certainement différent de celui qu'il était lors de leur collecte. Par conséquent, si l'on souhaite récupérer des fructanes de DP élevés à partir d'aguamiel, il est conseillé de prévoir un traitement d'inactivation adéquat pour éviter toute dégradation enzymatique post-récolte.

## D. CONCLUSION

En résumé, malgré quelques petites variations, la composition de l'aguamiel est stable tout au long de la période de production. Une composition moyenne peut donc être définie (cf Tableau 14).

L'absence de variabilité dans la composition de cette matière première devrait faciliter la commercialisation à l'échelle industrielle sous forme de boissons. Cela permettrait de maintenir et valoriser la culture des agaves dans les régions semi-désertiques du Mexique.

**Tableau 14 : Composition moyenne de l'aguamiel d'Agave pulquéro.**

% (Base sèche )	Moyenne
Fructose	32,4 ± 3,9
Glucose	26,5 ± 2,7
Saccharose	8,8 ± 6,5
Fructo-oligosaccharides	10,2 ± 5,7
AA libres	0,26 ± 0,05
Protéines	3,0 ± 0,6
Cendres	3,3 ± 0,8

Toutefois, étant donné les faibles concentrations en composés d'intérêt, la rentabilité économique d'un procédé de purification de fructanes par technologie membranaire à partir de cette matière première risque d'être limitée. Il nous a donc paru opportun de nous intéresser à une autre source de fructanes à savoir les cœurs d'agave. La caractérisation de cette nouvelle matière première fait l'objet du chapitre suivant.



## II. CARACTERISATION DES FRUCTANES EXTRAITS DU COEUR ET DES FEUILLES D'AGAVES

Si la présence de structures de type fructanes dans les cœurs d'agave (*Agave. vera cruz*, *Agave tequilana* et *Agave americana*) a déjà été rapportée de manière sporadique depuis 1950, c'est en 2006 que Mancilla-Margalli *et al.* ont publié la structure détaillée des fructanes présents dans les agaves et notamment l'*Agave tequilana*. Au démarrage de ce projet de thèse (Mars 2005), aucune publication ne donnait la composition et la structure des fructanes extraits du cœur d'agave pulquéro. Nous avons donc entrepris une démarche d'extraction et de caractérisation partielle des fructanes dans les échantillons d'agave pulquéro (*Agave mapisaga*) en utilisant les fructanes d'*Agave tequilana* comme témoins.

### A. EXTRACTION DES FRUCTANES A PARTIR DU COEUR ET DES FEUILLES D'AGAVE PULQUERO.

Les fibres du cœur et des feuilles d'agave pulquéro (Figure 26) ont été utilisées pour l'extraction des substances solubles dans l'eau. Deux plantes à différents stades de maturité ont été choisies, une plante en début de production (plante A) et une seconde plante en fin de production d'aguamiel (plante B).

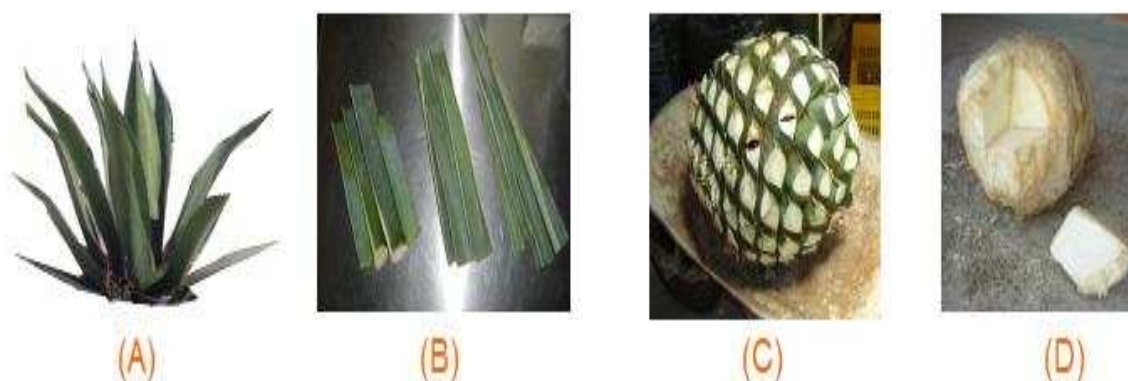


Figure 26 : Photo d'agave pulquéro (*Agave mapisaga*) (A), d'échantillons de feuilles (B) et de cœur (C-D) de la plante.

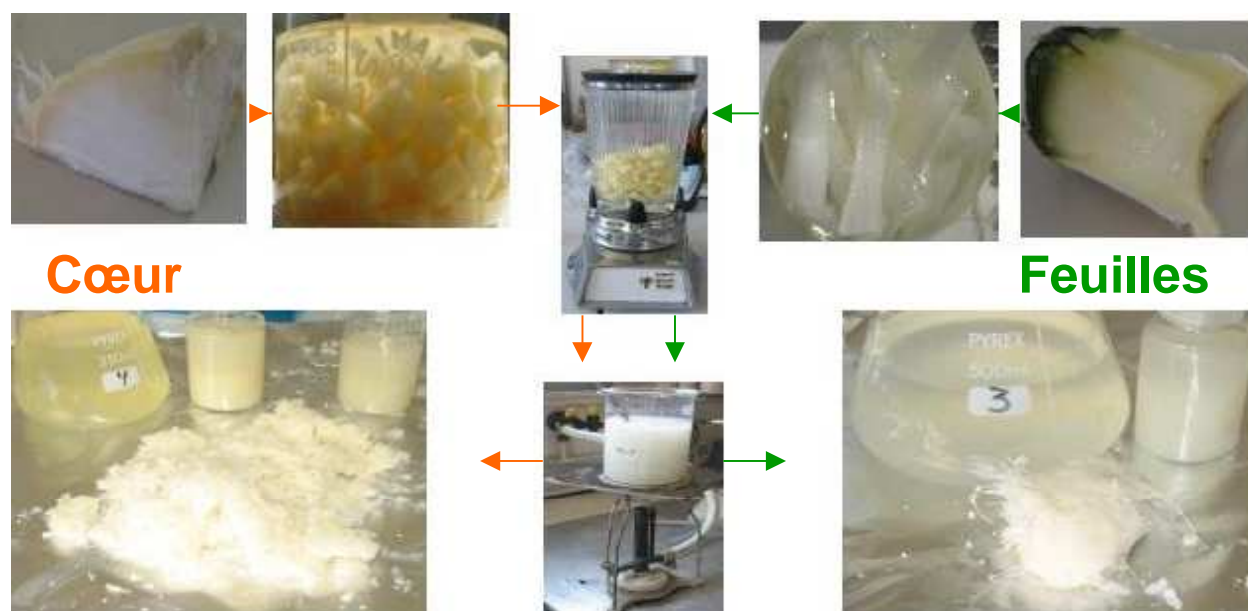


Figure 27 : Extraction de la fraction soluble dans l'eau du cœur et des feuilles d'agave pulquéro.

Le protocole d'extraction suivi est détaillé sur la Figure 27. La matière végétale à extraire est broyée en présence d'eau puis portée à 80°C pendant 15 min pour éviter toutes dégradations ultérieures des fructanes par les enzymes endogènes.

On a ensuite procédé à une précipitation des fructanes par de l'alcool selon la méthode décrite dans le chapitre 2.I.B.2. Les culots obtenus sont lyophilisés et stockés en vue d'analyses. Les rendements d'extraction des fructanes de haut DP exprimés en g de produit lyophilisé par kg de fibre, sont présentés dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Rendements d'extraction des fructanes obtenus par précipitation à l'éthanol à partir des échantillons du cœur et feuilles d'agave pulquéro : A) au début et B) après production d'aguamiel.

	Fructanes haut DP (g.kg <sup>-1</sup> )	
	A	B
<b>Feuille</b>	9,6	7,7
<b>Cœur</b>	21	8,5

En début de production d'aguamiel, la teneur en fructanes de l'agave est deux fois plus importante dans le cœur (21 g.kg<sup>-1</sup>) que dans les feuilles (9,6 g.kg<sup>-1</sup>), alors qu'en fin de production, ces concentrations sont très similaires et égales respectivement à 7,7 et 8,5 g.kg<sup>-1</sup> pour les feuilles et le cœur d'agave pulquéro. La réduction de la concentration en fructanes du

cœur d'agave en fin de production d'aguamiel apparaît comme logique et résulte de l'extraction continue et sur une période de plusieurs mois d'un jus riche en sucres et FOS (voir section I). Si le rendement obtenu semble être très faible en comparaison de celui rapporté par Waleck *et al.* en 2008 pour l'*Agave tequilana* (260 g de fructanes de DP  $\geq 3$  par kg de fibres), il est comparable aux valeurs données par Martinez Torres en 2007 qui mentionne une concentration de 9 à 22 g.Kg<sup>-1</sup> de fructanes extraits à partir des fibres de feuilles d'*Agave atrovirens* (variété d'agave pulquéro aussi utilisée pour la production d'aguamiel).

## B. COMPOSITION DES PRECIPITES OBTENUS A PARTIR DES FEUILLES ET DU COEUR D'AGAVE PULQUERO

Les concentrations en oses neutres des solutés solubles dans l'eau et précipitables à l'alcool obtenues à partir des feuilles et du cœur d'agave pulquéro sont présentées dans le Tableau 16. On constate que le fructose (identifié lors des analyses sous forme de mannose et de glucose) est le sucre majoritaire des fractions extraites des feuilles d'agave pour les deux états de maturité. Ces fractions renferment également d'autres sucres et en particulier du xylose, de l'arabinose et du galactose dont la présence a déjà été signalée dans les extraits de bagasse d'*Agave tequilana* (Alonso-Gutierrez 2005). Ces sucres pourraient provenir d'une hydrolyse partielle des polysaccharides pariétaux. En ce qui concerne les extraits obtenus à partir du cœur d'agave, on constate qu'ils sont plus riches en arabinose et en galactose que les feuilles, et ceci pour les deux stades analysés. Ces sucres provenant d'hémicelluloses ont été également identifiés dans les bagasses de l'*Agave tequilana W. cv azul* et en particulier lors de la cuisson du cœur d'agaves pour l'extraction à chaud.

**Tableau 16 : Composition glucidique des précipités extraits à partir des échantillons du cœur et feuilles d'agave pulquéro : A). au début et B) après production d'aguamiel.**

Echantillon	% molaire				
	Arabinose	Xylose	Mannose	Galactose	Glucose
Feuille A	12,4	6	47,7	12,2	21,7
Cœur A	20,2	3,9	23,5	24,2	28,2
Feuille B	12,7	4,6	41,1	15,8	25,8
Cœur B	16,5	6,6	32,8	21,3	22,8

### C. DETERMINATION DU PROFIL DE DISTRIBUTION DES MASSES MOLAIRES DES FRUCTANES EXTRAITS A PARTIR DU COEUR ET DES FEUILLES D'AGAVE

#### 1. Agave pulquéro

Chacune des quatre fractions de fructanes isolées précédemment à partir du cœur et des feuilles d'agave pulquéro a été analysée en chromatographie d'exclusion stérique (CLHP-SEC ) sur colonnes Shodex. Les profils chromatographiques obtenus sont présentés sur la Figure 28.

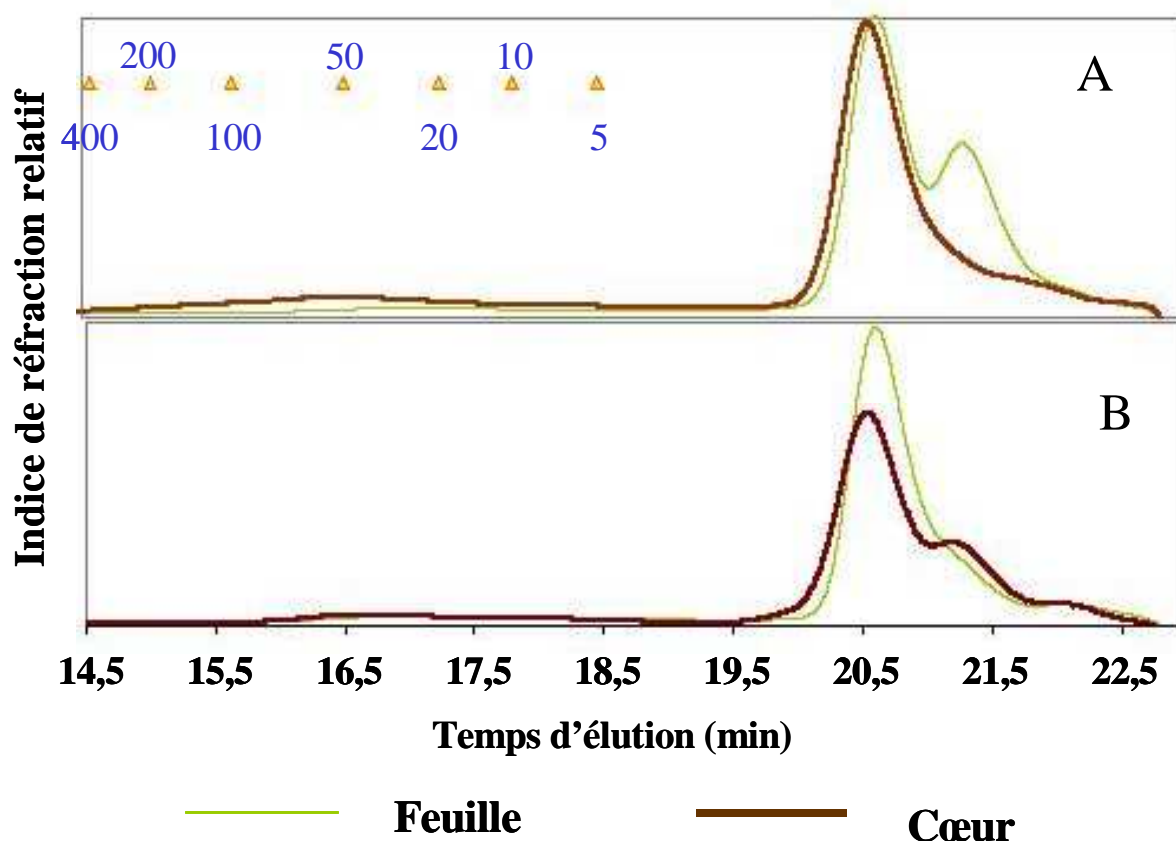


Figure 28 : Profils des extraits de fructanes isolés à partir des feuilles et du cœur d'agave pulquéro A) au début et B) après production d'aguamiel obtenus par CLHP d'exclusion stérique sur colonnes Shodex.

On constate que les profils de distribution des masses molaires sont différents selon l'origine de la matière première (feuille ou cœur) d'une part et d'autre part que ces profils évoluent au cours de la maturation de l'agave. En effet, en début de production les feuilles présentent un pic majoritaire (Masse moléculaire 0,579 kDa) avec un épaulement conséquent correspondant à une famille de fructanes de masse molaire plus faible (temps de rétention de 21min, Masse moléculaire 0,278 kDa). En ce qui concerne les fructanes du cœur d'agave pris au même temps de production, on ne retrouve qu'un seul pic correspondant à une Masse moléculaire égale à 0,611 kDa.

Dans les feuilles d'agave prises en fin de production (Feuille B), le pic majoritaire à de masse moléculaire 0,575 kDa est toujours présent mais l'épaulement a disparu. On ne retrouve plus à ce temps de production de fructanes de plus faible masse moléculaire. Par contre on constate que ce pic est apparu dans le profil chromatographique des fructanes extraits du cœur d'agave. Ce profil présente un pic majoritaire correspondant à des fructanes de masse moléculaire moyenne de 0,617 kDa et un second pic (épaulement) correspondant à des fructanes de masse moléculaire moyenne de 0,303 kDa. Pour expliquer ce phénomène, on peut émettre l'hypothèse que la plante au cours de la maturation et de l'exploitation de l'agave, mobilise ces fractions de plus faible DP pour répondre au stress engendré par l'excision du cœur de l'agave. Elle stockerait alors dans le cœur d'agave les fractions de plus faible masse produites par les feuilles au début de la production d'aguamiel. La migration des fructanes des feuilles vers le cœur s'accompagne d'un certain nombre de phénomènes. Les feuilles changent de couleur et s'inclinent vers le sol en se séparant du cœur. Ce dernier change lui aussi, il se dessèche et la production d'aguamiel chute.

La mise en évidence de la présence de fructanes dans le cœur d'agave en fin de période de production d'aguamiel est intéressante. Elle fournit aux agriculteurs une nouvelle voie de valorisation des coeurs d'agave après leur exploitation pour la production d'aguamiel améliorant ainsi les revenus potentiels de la culture d'agave pulquéro.

On remarque aussi dans les profils présentés sur la Figure 28, la présence de polysaccharides de haute masse molaire (45,7 kDa) mais en très faible concentration par rapport à la concentration des fructanes et des sucres présents dans les extraits. Il est possible que cela corresponde aux structures polysaccharidiques de haute masse molaire identifiées dans l'aguamiel. Ces polysaccharides ne correspondant pas à des fructanes, ils devront être éliminés lors de l'étape de clarification préalable aux étapes de fractionnement.

## 2. *Agave tequilana*

Afin de comparer le contenu glucidiques des *Agaves tequilana* et pulquéro, les fructanes des feuilles et du cœur d'*Agave tequilana* ont été isolés et analysés en chromatographie d'exclusion stérique sur colonnes Shodex. D'après les profils obtenus et présentés sur la Figure 29, les fructanes isolés à partir du cœur et des feuilles d'*Agave tequilana* ont des masses moléculaires plus de deux fois supérieures à celles des fructanes d'agave pulquéro. Les masses moléculaires moyennes sont respectivement égales 1,49 kDa et

à 1,56 kDa pour les fructanes des feuilles et du cœur. Ces valeurs sont très proches de celle trouvée pour l'inuline des *Artichauts de Jerusalem* dont la masse moléculaire moyenne est égale à 1,61 kDa (Inuline de DP>10 exempte de FOS).

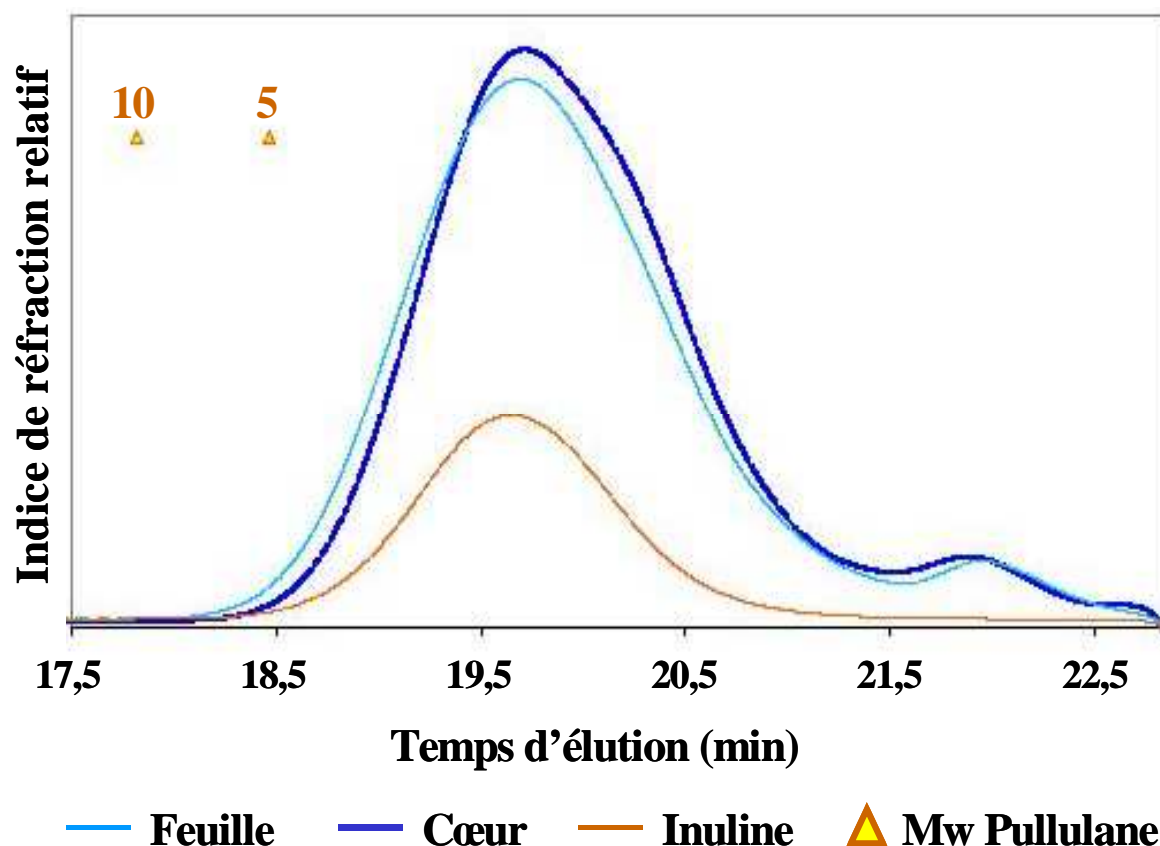
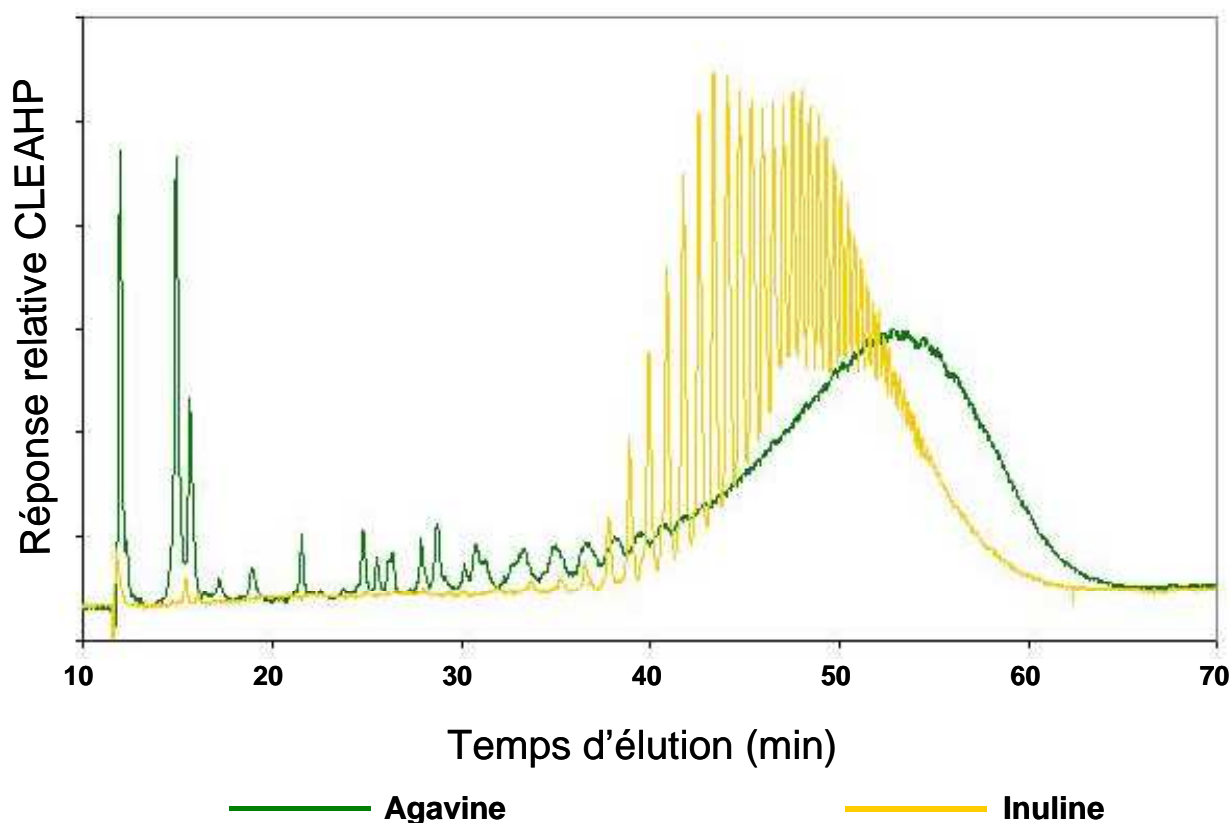


Figure 29 : Comparaison des profils de distribution en masse obtenus par chromatographie d'exclusion stérique sur colonne Shodex des extraits de fructanes isolés à partir des feuilles et du cœur d'*Agave tequilana* et d'inuline d'*Artichaut de Jérusalem*.

#### D. POLYDISPERSITE DES FRUCTANES : MISE AU POINT D'UN GRADIENT EN CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'ANIONS.

La caractérisation des fructanes par CLHP-SEC sur colonne Shodex nous a permis de définir la distribution des masses molaires des fructanes extraits, mais cette technique ne permet pas de séparer de façon suffisamment fine les fructanes sur la base de leur degré de polymérisation (DP). Or si nous envisageons le fractionnement des fructanes par des techniques membranaires, il est nécessaire de disposer d'une technique d'analyse plus fine permettant d'évaluer l'efficacité d'une étape de filtration. Nous nous sommes donc intéressés à la chromatographie liquide haute performance d'échange d'anions (CLEAHP) sur système Dionex avec une détection ampérométrique pulsée. Cette technique permet de séparer les oligosaccharides en fonction de leur degré de polymérisation. Nous avons donc étalonné notre

colonne (CarboPac PA100) d'échange d'anion avec de l'inuline de chicorée ou d'artichaut et avec de l'agavine isolée à partir d'*Agave tequilana* fournie par la Société Agaviotica (FRUCTAGAVE PR-95). Les profils caractéristiques de polydispersités de l'inuline de chicorée et des agavines d'*A. tequilana* (4 g.L<sup>-1</sup>) sont présentés dans la Figure 30.



**Figure 30 : Profils de distribution obtenus par CLEAHP avec une détection ampérométrique pulsée pour les agavines d'*Agave tequilana* et l'inuline de Chicorée dans les mêmes conditions de gradient d'élution sur le système Dionex.**

L'inuline de chicorée correspond à une seule famille de fructanes (polymère linéaire de résidus de fructose liés par des liaisons  $\beta(2\rightarrow1)$ ). Comme les fructanes présents diffèrent selon leur nombre de résidus fructose, on obtient en CLEAHP une parfaite séparation des fructanes en fonction de leur DP selon une distribution caractéristique présentée Figure 30. Le profil obtenu pour l'agavine est différent, il n'y a pas de séparation entre les oligosaccharides, on obtient un massif d'oligosaccharides. Ceci s'explique par la complexité des fructanes d'agave. L'analyse des liaisons glycosidiques de l'extrait d'agavine fourni par la société Agaviotica FRUCTAGAVE PR-95 (chapitre 3.I.C.2.b) a montré la présence des éthers de 2,3,4,6-Glc, de 3,4,6- Fruc (3,4,6-Glc et de 3,4,6-Man), de 1,3,4-Fruc (1,3,4-Glc et 1,3,4-

Man) et de 3,4-fruc (3,4-Glc et 3,4-Man). Il y a donc des structures de type inuline, lévulane et graminane branché dans l'extrait d'*Agave tequilana* qui nous sert de témoin pour optimiser la chromatographie ionique.: à savoir des fructanes de type inuline, levane, néoséries, et graminanes branchés. Toutes ces familles se superposent l'une à l'autre lors de la chromatographie CLEAHP sur système Dionex ce qui rend la séparation beaucoup moins précise que dans le cas de l'inuline.

L'utilisation de la CLEAHP pour séparer les fructanes de type inuline dans la littérature est abondante (Farine *et al.* 2001; L'homme *et al.* 2001; Corradini *et al.* 2004), mais la difficulté à séparer l'agavine par CLEAHP a été rapportée récemment dans la littérature (Waleckx *et al.* 2008). Ces auteurs montrent que la séparation d'agavines avec un DP supérieur à 10 est difficile et donne un massif comme présenté sur la figure 5. Nous avons donc réalisé plusieurs essais pour mettre au point un gradient d'élution en acétate afin d'obtenir une meilleure séparation des agavines de DP compris 1-80. Le gradient optimal obtenu est décrit dans le chapitre matériels et méthodes (2.II.C.3.c). Il nous a permis de séparer les agavines par paquets correspondants à un degré de polymérisation moyen. On a pu ainsi visualiser de façon plus précise la polydispersité des agavines du cœur d'agave pulquéro et *A. tequilana*.

a. Polydispersité des extraits d'*Agave tequilana*

La Figure 31 confirme que la polydispersité des agavines d'*Agave tequilana* est plus grande que celle des inulines d'*Artichaut de Jerusalem*, (voir Figure 30). Le saccharose (DP2) et le nystose (DP4) ont été utilisés pour calibrer et pour identifier les temps d'élution des sucres et FOS dans notre gradient, alors que l'inuline d'artichaut a été utilisée comme témoin pour les fructanes de DP supérieur à 10. Les extraits de jus d'*Agave tequilana* et le produit FRUCTAGAVE PR-95 ont présenté un profil de dispersion de DP très similaire, ce qui valide la méthode d'extraction des fructanes utilisée dans le cadre de cette étude.

Le profil CLEAHP des agavines présenté sur la Figure 31 met en évidence la présence de mono et de disaccharides dans les premières 5 minutes d'élution, les FOS sont élués entre 15 et 30 minutes et les agavines de DP>10 sont élués aux mêmes temps que les fructanes de l'inuline témoin soit entre 30 et 80 minutes d'élution. La numération des pics de l'inuline témoin nous a permis d'attribuer un DP moyen aux fractions des agavines séparées,



cette numération sera utilisée dans toutes les expériences de fractionnement des fructanes lors des essais de séparation sur membranes. Lopez *et al.* (2003) ont trouvé un DP moyen des agavines d'*Agave tequilana* (après précipitation à l'éthanol) compris entre 3 et 29, alors que Marcilla *et al.* (2006) ont mentionné un DP moyen de 18 et Waleck *et al.* en 2008 ont rapporté une valeur de DP égale à 14. D'après le profil CLEAHP présenté sur la Figure 31, on retrouve parmi les agavines d'*Agave tequilana* des fructanes de DP allant de 10 à 80 par rapport au temps d'élution de l'inuline témoin.

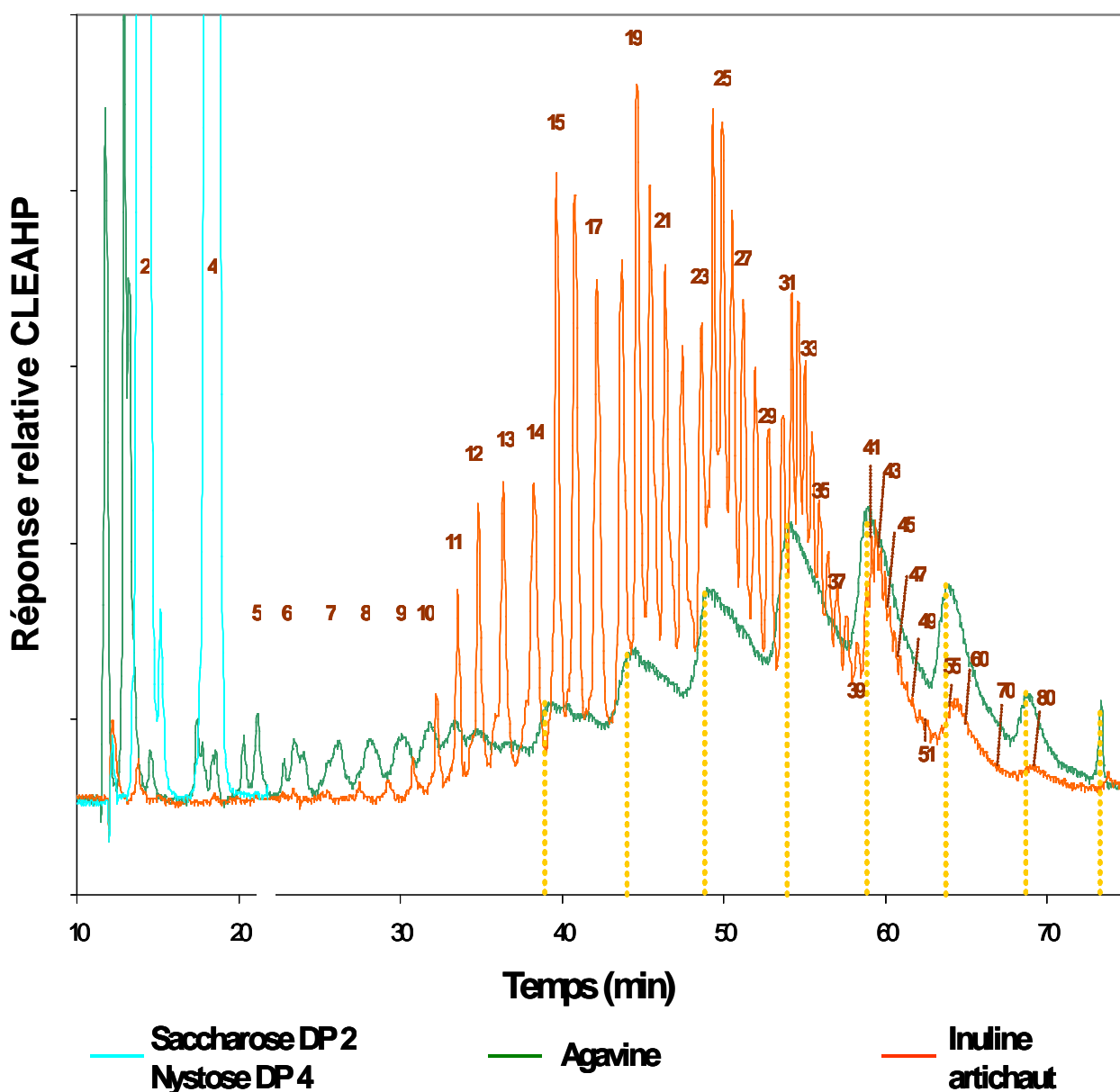


Figure 31 : Profils de distribution obtenus par CLEAHP avec une détection ampérométrique pulsée des agavines extraites à partir du cœur d'*Agave tequilana* et de l'inuline d'*Artichaut de Jérusalem* dans les mêmes conditions de gradient d'élution sur le système Dionex.

b. Polydispersité des fructanes extraits du cœur d'agave pulquéro

Les fructanes extraits à partir du cœur d'agave pulquéro présentent un profil de distribution différent de celui des agavines isolées à partir du cœur d'*Agave tequilana*. La Figure 32 montre la présence de pics correspondant principalement à des FOS (temps d'élution 15-30 min), avec une structure moins complexe permettant une meilleure séparation et une meilleure définition des FOS. On identifie également dans cet extrait, des fructanes de DP supérieur à 10 mais le  $DP_{max}$  est de 25.

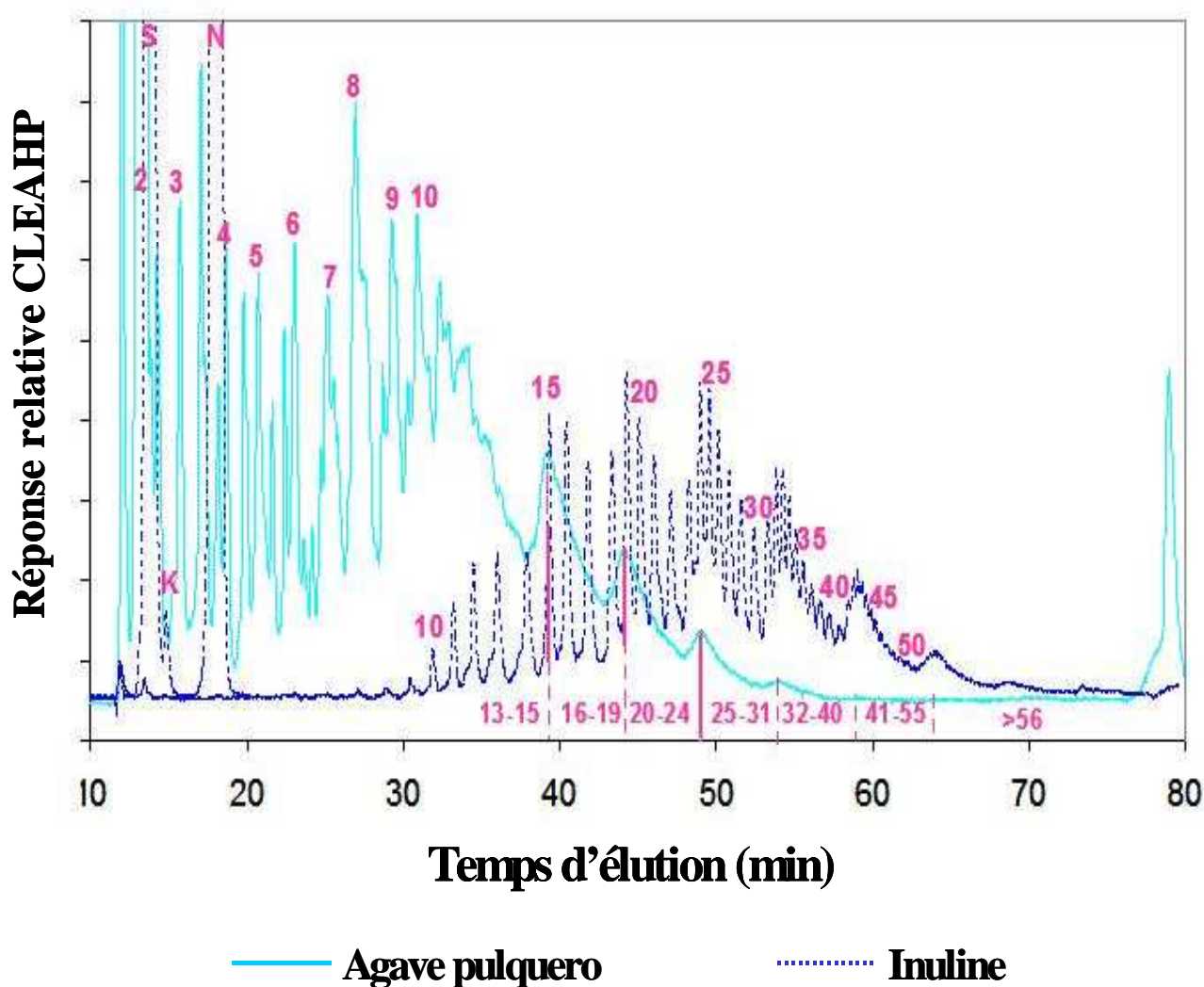


Figure 32 : Profils de distribution obtenus par CLEAHP avec une détection ampérométrique pulsée pour les agavines extraites à partir du cœur d'*agave pulquéro*\_ avant la production d'aguamiel et l'inuline d'Artichaut dans les mêmes conditions de gradient d'élution sur le système Dionex.

Ces résultats expliquent pourquoi lors de l'analyse de l'aguamiel, la présence de fructanes de haut DP n'a pas été mise en évidence. Cette variété d'agave ne semble pas produire de fructanes de haut DP.

## E. BILAN

La mise au point du gradient spécifique en CLEAHP permettant de séparer les agavines est un outil indispensable pour identifier et caractériser les échantillons de jus d'agave à traiter d'une part et pour suivre le rendement et l'efficacité des procédés membranaires lors du fractionnement des agavines d'autre part. Cette étape de mise au point nous a permis aussi de mettre en évidence de grandes différences entre les espèces d'agaves (*Agave mapisaga* (pulquéro) et *Agave tequilana*) et des différences par rapport à la bibliographie (López *et al.* 2003; Mancilla-Margalli et Lopez 2006; Waleckx *et al.* 2008). Comme les extraits de cœur d'*Agave tequilana* renferment des fructanes présentant une plus large dispersité (DP de 3 à 80), il nous a paru plus pertinent de poursuivre notre étude avec cette matière première. A partir de ces extraits, il sera en effet possible de fractionner les fructanes d'agave en trois fractions : une fraction riche en fructanes de  $D_p > 40$ , une fraction riche en fructanes de  $10 < D_p < 40$  et enfin une fraction riche en FOS.

### III. CLARIFICATION ET FRACTIONNEMENT DES FRUCTANES D'AGAVES PAR TECHNOLOGIE MEMBRANAIRE.

Intégrer une technologie membranaire au sein d'un procédé de purification n'est pas aussi simple qu'il n'y paraît *a priori*. Il n'est pas possible de se baser sur les seules informations données par les fabricants de membranes pour prévoir directement quelles seront les performances d'une opération de filtration en fonctionnement industriel. Une étude préalable réalisée à l'échelle du laboratoire sur plusieurs membranes susceptibles de répondre aux objectifs du procédé, ainsi que des tests à l'échelle pilote s'avèrent toujours nécessaires. Pour garantir le succès de l'intégration d'une étape de filtration sur membranes au sein d'un procédé de purification, Estelle Darnon a proposé dans le cadre de sa thèse de doctorat, une méthode relativement simple comprenant 3 étapes principales à savoir : dans un premier temps, l'analyse du procédé et la définition des spécifications de la séparation, dans un second temps l'identification de la membrane adéquate puis enfin une étape de modélisation et simulation pour établir le dimensionnement de l'installation à l'échelle industrielle (cf : chapitre 1.IV) (Darnon 2001).

Nous avons donc choisi de suivre la démarche proposée pour purifier les fructanes présents dans les jus extraits des cœurs d'*Agave tequilana*. Pour s'affranchir de problèmes d'approvisionnement en matière première, l'étude a été réalisée en grande partie avec une solution modèle préparée à partir de poudre d'agave commerciale (Agaviotica PR-95). Toutefois pour confirmer nos résultats, des essais sur solutions réelles ont également été réalisés.

Par manque de temps, seules les deux premières étapes de la démarche proposée par Darnon ont pu être traitées dans le cadre de ce travail et sont présentées ci-après.

#### A. ANALYSE DU PROCEDE

Cette étape, comme on l'a vu précédemment (cf : chapitre 1.IV) consiste en la définition des objectifs de la séparation en s'appuyant sur la connaissance de la solution à traiter d'une part et sur les spécifications à atteindre d'autre part.

D'après les résultats rapportés dans la section II de ce chapitre, les jus d'extraction des cœurs d'agaves contiennent outre des fructanes de masses molaires très dispersées (DP variant de 3 à 80), des sucres, des protéines, des minéraux et autres impuretés propres aux extraits végétaux (gommes, fibres insolubles etc.). Le fractionnement et la purification sur la base de leur masse molaire ne peuvent être atteints que grâce à une succession d'étapes membranaires mettant en œuvre des membranes d'ultrafiltration et de nanofiltration, comme on peut le voir sur la Figure 33.

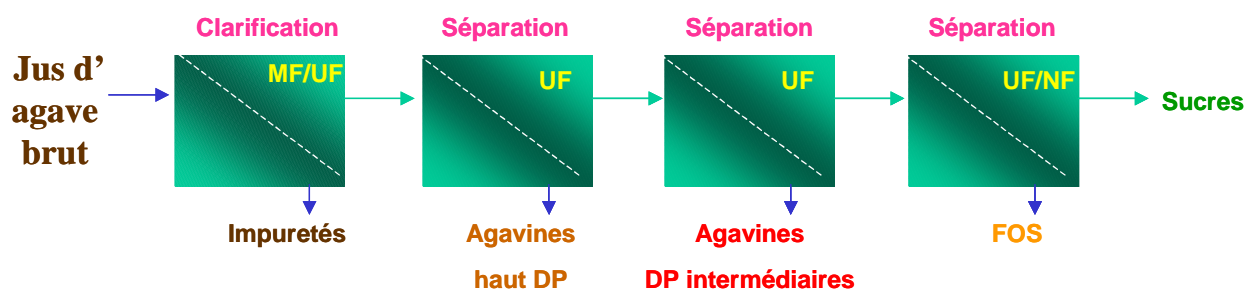


Figure 33 : Proposition de couplage de procédés membranaires pour le fractionnement et la purification d'agavines et de FOS à partir d'un extrait de jus brut d'*Agave tequilana*.

Après une première étape de clarification du jus, indispensable pour éliminer les composés macromoléculaires extraits en même temps que les fructanes, on peut envisager une cascade de filtrations visant à récupérer trois fractions différentes :

- une fraction enrichie en fructanes de haut DP
- une fraction enrichie en fructanes de DP intermédiaires
- une fraction ne retenant que des FOS et exempte de mono et disaccharides

Pour garantir la faisabilité économique de ces opérations, il est nécessaire de fixer pour chacune de ces étapes des spécifications à atteindre en termes de flux et de rétention et/ou degré de pureté:

- Concernant les flux, ceux-ci devront évidemment être les plus importants possibles et ce, même lorsque les solutions seront concentrées. Ainsi pour le pré-choix des membranes, nous avons choisi d'éliminer toutes les membranes conduisant à des flux trop faibles<sup>1</sup> lorsque le FRV augmente.
- Concernant les taux de rétention et les facteurs de pureté, les spécifications à atteindre seront données lors de la discussion du pré-choix des membranes, ceci dans un souci de clarté.

<sup>1</sup> La valeur limite de flux dépendant de l'opération étudiée.

## **B. CHOIX DES ETAPES DE SEPARATION MEMBRANAIRES**

### **1. Pré-sélection des membranes pour le fractionnement des fructanes**

Afin de choisir la membrane la plus adaptée pour une étape de filtration, il est nécessaire de pré-sélectionner plusieurs membranes susceptibles de convenir au procédé. Vu la diversité des formes des molécules et la distribution souvent non homogène des pores d'une membrane, il convient de choisir un seuil de coupure « idéal », inférieur de deux à trois fois à la taille de la molécule que l'on veut retenir (Zeman et Zydney 1996).

De plus, les solutions biologiques sont généralement complexes et renferment des espèces chimiques susceptibles d'interagir avec les membranes. Il est alors intéressant de tester des matériaux de nature différente qui vont permettre de favoriser ou non certaines liaisons et induire ainsi des changements sur le flux de perméat et la rétention des espèces. Nous avons donc décidé d'étudier les performances de membranes organiques et minérales. Or, en raison des différences de géométrie (plane pour les membranes organiques, tubulaire pour les membranes inorganiques), les modes opératoires de pré-sélection sont différents. C'est pourquoi les résultats des tests de pré-sélection seront rapportés en fonction du type de membranes étudié.

#### **a. Membranes organiques**

La pré-sélection de membranes en filtration tangentielle peut très vite s'avérer coûteuse en temps, en solution, en membranes... Or, sur la base des résultats rapportés par E. Darnon, cette pré-sélection peut être réalisée en filtration frontale. En effet, cette dernière a montré que les performances de différentes membranes obtenues en filtration frontale étaient extrapolables pour estimer les performances attendues en filtration tangentielle.

Ainsi, toutes les membranes organiques pré-sélectionnées ont été testées en filtration frontale dans une cellule agitée Amicon®. Ces essais ont été réalisés à pression constante (2 bar) avec une solution d'agavine préparée à 2% dans de l'eau osmosée. Vu les faibles volumes mis en jeu (de 50 à 250 mL), il a été possible d'atteindre pour chaque membrane testée, des Facteurs de Réduction Volumique (FRV) élevés compris entre 5 et 10.

Afin d'éliminer les impuretés et les polymères de haut DP présents dans la solution modèle (des composés de masse moléculaire proche de 50 000 Da ont en effet été mis en évidence dans cette solution par chromatographie d'exclusion), une première série de filtration a été réalisée avec des membranes à base de polyéthersulfone (PES) provenant de 3 fournisseurs différents et présentant toutes un seuil de coupure de 30 kDa. Les flux de perméation obtenus pour un FRV de 1,05 (qui correspondent en fait au premier flux mesurable sur une membrane donnée dans les conditions expérimentales testées) sont rapportés dans le Tableau 17.

**Tableau 17 : Comparaison des flux et estimation du colmatage irréversible lors de la filtration frontale d'une solution modèle à 2% d'agavines sur des membranes à base de PES 30 kD (FRV 1,05 ; 350 rpm ; 2 bar ; 20°C).**

Fournisseurs Membranes PES	Sartorius	Pall	Millipore
Flux (L.h <sup>-1</sup> .m <sup>-2</sup> ) sol. agavines 2%	85	68	86
% Colmatage	39	33	60

Les valeurs rapportées dans le Tableau 17 sont assez élevées (de l'ordre de 70 à 90 L.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup>) mais il faut préciser que les flux chutent très rapidement dans les premières minutes de filtration. On observe en effet des pertes de perméabilité de l'ordre de 30 à 50% qui traduisent la mise en place d'un colmatage des membranes mesuré en fin d'expérience selon le protocole décrit au 2.III.C.3.

Ce colmatage est toutefois insuffisant pour modifier la sélectivité des membranes et permettre une rétention différentielle des fructanes. En effet les profils de composition des perméats et rétentats obtenus avec ces membranes ne présentent pas de différences significatives. Par conséquent, aucune de ces membranes ne peut être retenue et si l'on souhaite fractionner les constituants de notre mélange, il est nécessaire d'envisager une filtration sur des membranes de seuils de coupure plus faibles.

Sur la base des travaux de Lorenzo *et al.* (1999), qui ont utilisé une membrane de 10 kDa pour clarifier un extrait d'inuline, de nouveaux essais mettant en œuvre 6 membranes de 10 kDa (cinq membranes à base de PES et une membrane à base de cellulose régénérée (CR)) ont été réalisés.

On a constaté, lors de la réalisation de ces essais que les performances étaient très différentes selon la membrane testée. On observe ainsi (Tableau 18) que pour des membranes fabriquées à partir d'un même polymère (PES) et affichant un même seuil de coupure nominal (10 kDa), les flux de perméation mesurés à FRV 1,05 varient de 17 à 145 L.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup>, soit encore dans un rapport de 1 à 8,5. Le % de colmatage irréversible est aussi très différent d'une membrane à l'autre et on constate même que la membrane la plus perméable présente le même % de colmatage (57%) que la membrane la moins perméable. La membrane à base de cellulose régénérée (CR) présente quant à elle, des performances moyennes en terme de flux (de l'ordre de 43 L.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup>) mais le colmatage évalué en fin de test avec cette membrane est négligeable (4%). Cela confirme le faible niveau d'interaction entre les molécules biologiques et les surfaces hydrophiles telles que la cellulose régénérée.

**Tableau 18 : Comparaison des flux et estimation du colmatage irréversible lors de la filtration frontale d'une solution modèle à 2% d'agavines sur des membranes de 10 kDa provenant de différents fournisseurs (FRV 1,05, 350 rpm, 2 bar, 20°C).**

Membranes 10 kDa	Millipore CR	Millipore	Koch	Orelis PES	Osmonic	$\alpha$ -Laval
<b>Flux</b> (L.h <sup>-1</sup> .m <sup>-2</sup> )	43	145	115	63	43	17
<b>% Colmatage</b>	4	57	13	24	44	55

Il existe également de grandes différences dans les profils de rétention obtenus avec les différentes membranes testées, comme on peut le voir sur la Figure 34. La membrane à base de CR est plus sélective que les membranes à base de PES. Elle retient les fructanes de DP>30 à plus de 90% ce qui correspond à un seuil de coupure réel de l'ordre de 5kDa.

En ce qui concerne les membranes à base de PES, leurs performances varient d'un fournisseur à l'autre. Les membranes Koch, Orelis et Millipore ne présentent quasiment aucune sélectivité vis-à-vis des fructanes contenus dans la solution modèle. Les taux de rétention sont très faibles et ce, quels que soient les DP considérés. Les membranes  $\alpha$ -Laval et Osmonic sont un peu plus sélectives et présentent des rétentions variables selon le DP. En fait, on constate dans le cas des membranes PES, que la rétention est d'autant plus grande que le flux de perméation est faible.



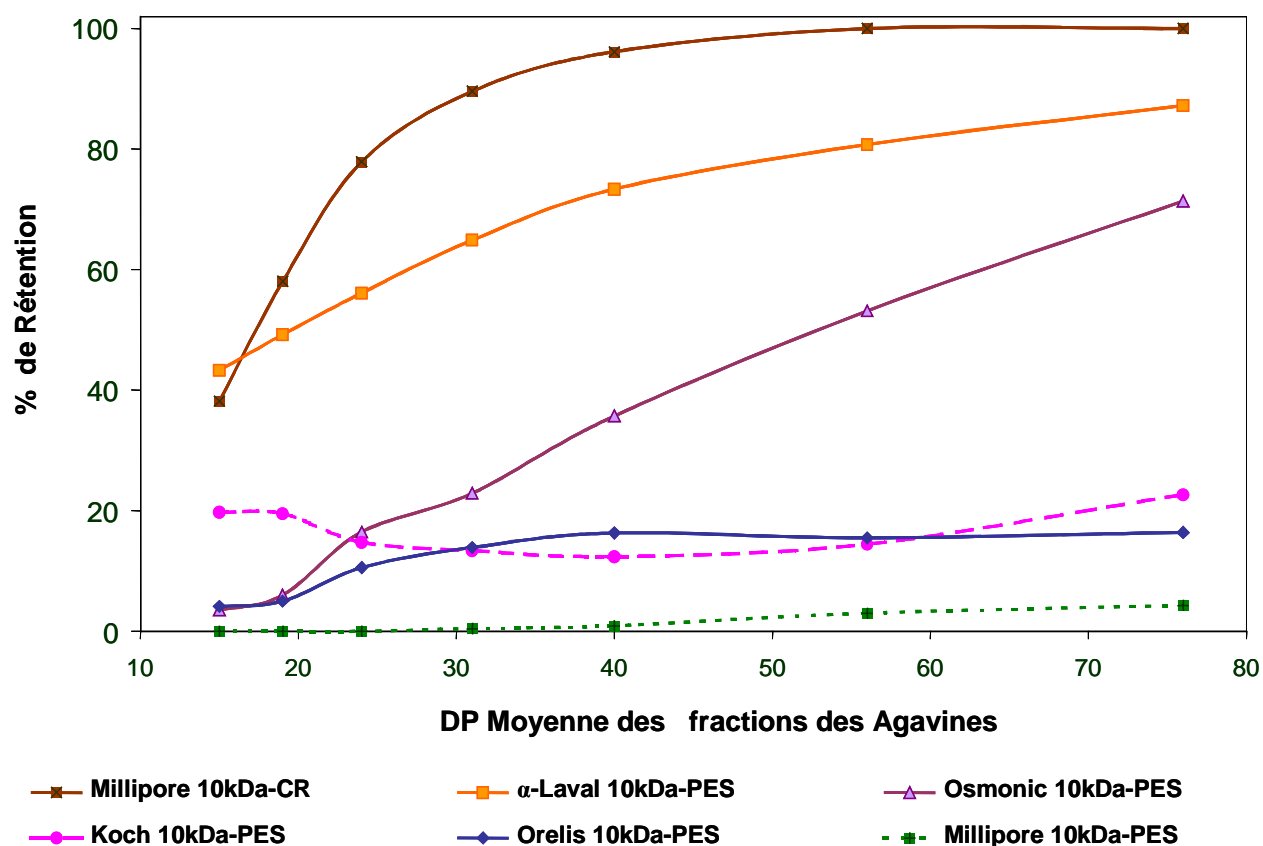


Figure 34 : Profils de rétention des fructanes d'une solution modèle à 2% d'agavines lors de filtration frontale sur différentes membranes 10 kDa (FRV 1,05, 350 rpm,  $\Delta P$  2 bar, 20°C).

D'après les résultats présentés ci-dessus, il apparaît que le mode d'élaboration des membranes joue un rôle important sur les performances de ces dernières. En effet, selon les fournisseurs, ce mode de fabrication peut être très différent (addition ou non de réactifs lors de la polymérisation, conditions opératoires différentes...). Cela va induire au niveau de la membrane des différences chimiques et physiques qui se traduiront par des propriétés de surface et des structures différentes. Ainsi, en fonction de l'état de surface des membranes, on observera une tendance au colmatage plus grande du fait de la mise en place d'interactions solutés/membrane. Dans d'autres cas, en raison d'une structure plus ouverte, les flux de perméation pourront être plus importants.

Pour mieux comprendre les différences de performances observées, nous avons réalisé des observations au microscope électronique à balayage des tranches de chacune de ces 5 membranes en PES et de la membrane en CR. On constate que toutes ces membranes sont constituées de deux couches: la première couche macroporeuse servant de support et la

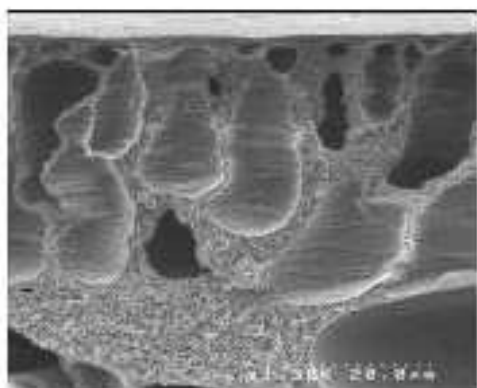
seconde couche beaucoup plus dense et plus ou moins épaisse constituant la couche active. Nous avons choisi de ne présenter sur la Figure 35 que les photos des couches actives. Au grossissement utilisé ici (x1500), il n'est pas possible de mettre en évidence des différences de seuil de coupure mais par contre, on peut constater que ces couches actives présentent des structures très différentes.

Les membranes Millipore 10 kDa-CR,  $\alpha$ -laval 10 kDa-PES, Orelis 10 kDa-PES et Osmonic 10 kDa-PES, présentent une structure dite en « doigts de gant » (Figure 35 A – D). Sous une fine couche de surface qui apparaît dense ici, on peut observer des macrovides allongés. Une telle structure est en principe destinée à limiter la résistance hydraulique de la membrane et à éviter les problèmes de colmatage interne du support. Les membranes Millipore 10kDa-PES, Koch 10kDa-PES (Figure 35 E et F) présentent au contraire une structure d'apparence plus dense, la couche active de la membrane Koch semble même être symétrique.

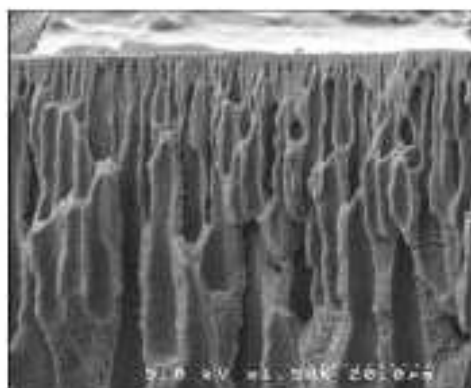
Nous pourrions nous attendre à ce que les 4 premières membranes soient plus perméables que les 2 dernières. Or nous observons le contraire. Les 4 premières conduisent à des valeurs moyennes de flux (de l'ordre de 40 à 60 L.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup>) voir même faibles dans le cas de la membrane  $\alpha$ -Laval 10 kDa-PES (17 L.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup>). De plus, ces 4 membranes sont plus ou moins sélectives (mis à part la membrane Orelis 10 kDa-PES) alors que les 2 dernières permettent d'obtenir des flux supérieurs à 100 L.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup> mais ne retiennent absolument pas les solutés présents.

La sélectivité des membranes repose donc en grande partie sur les propriétés de la fine couche de surface. En fonction de la taille des pores (non visible ici), des interactions potentielles entre le matériau et les solutés, les solutés seront plus ou moins retenus pouvant ainsi générer un colmatage de surface qui entraînera une réduction des flux. Il n'est donc pas possible de prévoir les performances d'une membrane sur la seule observation de sa structure.

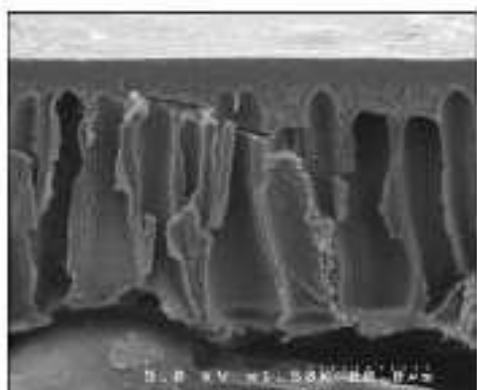
A l'issue de ces essais de filtration réalisés sur des membranes 10 kDa, il apparaît que pour réaliser le fractionnement de fructanes d'agave, le seuil de coupure réel de la membrane doit être de l'ordre de 5 kDa. Pour élargir nos possibilités de choix de membranes,



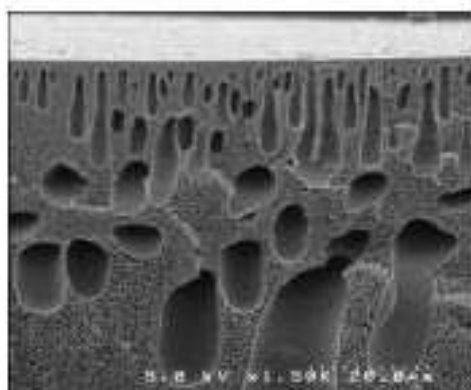
**A) Millipore 10 kDa-CR**



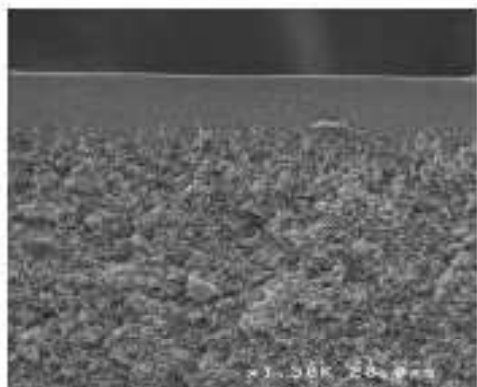
**B) α-Laval 10 kDa-PES**



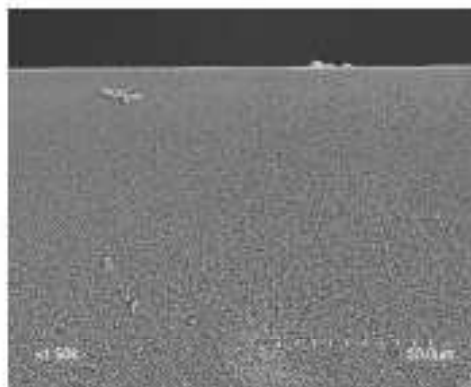
**C) Osmonic 10 kDa-PES**



**D) Orelis 10 kDa-PES**



**E) Millipore 10 kDa-PES**



**F) Koch 10 kDa-PES**

Figure 35 : Photos obtenues par microscopie électronique à balayage de tranches de membranes polymères 10kDa provenant de différents fournisseurs (grossissement x 1500).

de nouveaux essais de filtration ont été réalisés avec 2 membranes à base de PES présentant un seuil de coupure de 5 kDa (membranes Koch 5 kDa-PES et Millipore 5 kDa-PES) et une membrane en polyamide présentant un seuil de coupure de 8,5 kDa (membrane Osmonic 8,5 kDa-PA). Les flux obtenus pour l'ensemble de toutes les membranes testées sont représentés en fonction du FRV sur la Figure 36.

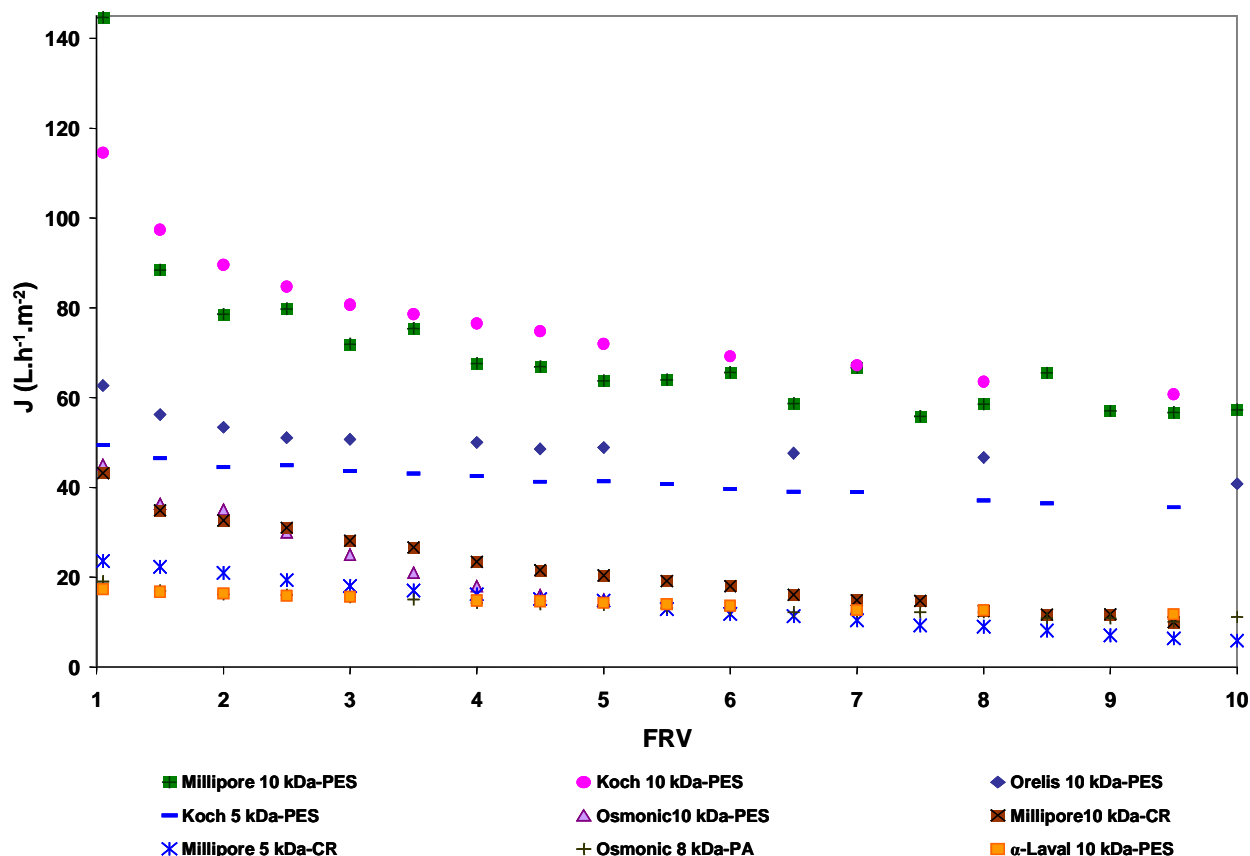


Figure 36 : Evolution des flux de perméat en fonction du FRV obtenus lors de la filtration frontale d'une solution modèle d'agavines sur différentes membranes polymères (2 Bar, 20°C, 350 rpm, concentration initiale 2%).

On constate et ce quelle que soit la membrane, que le flux de perméat diminue au fur et à mesure que le FRV augmente. Nataraj *et al.* (2008) ont observé un comportement similaire lors de la concentration d'une solution de polysaccharides et a attribué ce phénomène au colmatage externe dû à l'accumulation des polysaccharides sur la surface de la membrane au cours de la concentration (Nataraj *et al.* 2008).

En effet d'après la littérature, l'évolution du flux peut être divisée en 2 domaines. Le premier domaine où on observe un déclin plus ou moins fort du flux correspond à la mise en place des phénomènes de colmatage et en particulier qui peut impliquer un colmatage interne

de la membrane. Cette première phase n'est pas toujours évidente car elle est plus ou moins rapide et il n'est alors pas possible de mesurer correctement le flux. Le second domaine où le déclin du flux est moins marqué et résulte de phénomènes de surface (colmatage éventuel de la couche de gel) (Mondor *et al.* 2000).

La représentation du flux rapporté au flux initial (% de perte de perméabilité) en fonction du FRV (Figure 37) met en évidence 2 types d'évolution des pertes de perméabilité différents, traduisant en fait la mise en place d'un colmatage différent.

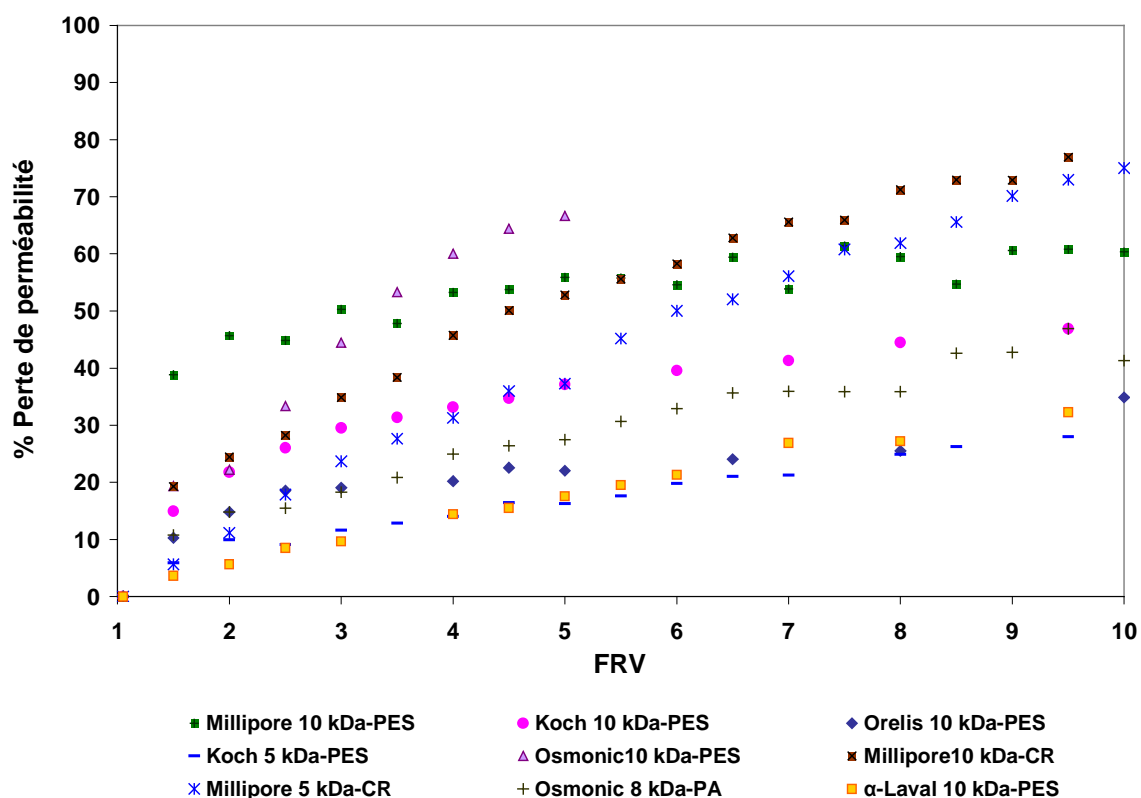


Figure 37 : Evolution de la perte de perméabilité (Flux/Flux initial) au cours de la concentration en filtration frontale d'une solution modèle d'agavines (2 Bar, 20°C, 350 rpm, concentration initiale, 2%).

Ainsi, on constate que la perte initiale de flux la plus importante (environ 40%) est observée lors de la filtration sur la membrane Millipore 10kDa-PES (Figure 37) qui présente le flux initial le plus élevé ( $145 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ ) mais aussi un taux de colmatage irréversible important (57%) (Tableau 18). Cette perte de flux qui se stabilise par la suite, traduit la mise en place rapide d'un colmatage irréversible et stable au cours de la concentration.

Au contraire, dans le cas de la membrane Osmonic 10 kDa-PES, la mise en place du colmatage est progressive, la perte de flux augmente de façon quasi continue pour atteindre la valeur de 70% pour un FRV final de 5. De plus, le colmatage généré avec cette membrane présente un caractère moins irréversible (44%) par rapport à celui obtenu avec la membrane Millipore 10kDa-PES.

Les évolutions des pertes de flux des autres membranes sont similaires à celles de la membrane Millipore 10 kDa-PES. On observe une perte de flux initiale plus ou moins importante puis une perte continue au fur et à mesure de la concentration, selon la membrane testée. Toutefois, on peut noter que les membranes à base de cellulose présentent un colmatage irréversible très faible (respectivement 4 et 7% pour les membranes Millipore 10 kDa-CR et Millipore 5 kDa-CR pour un FRV de 10). Il en est de même pour la membrane à base de polyamide (membrane Osmonic 8,5 kDa-PA) qui présente un % de colmatage irréversible égale à 9% pour un FRV de 10. Ces 2 types de matériau ne présentent que de très faibles interactions avec les polysaccharides. Ce n'est pas le cas pour les membranes à base de PES où l'on observe en effet un % de colmatage irréversible égal à 50% avec la membrane Koch 5 kDa-PES. L'influence des propriétés de surface de la membrane et en particulier de son caractère hydrophile sur les interactions matériau/molécules biologiques et le rôle de ces dernières sur les flux ont déjà été rapportés dans la littérature (Susanto et Ulbricht 2005).

Les profils de rétention obtenus pour les membranes testées mis à part les membranes Koch 10kDa-PES, Orelis10kDa-PES et Millipore10kDa-PES qui ne présentent aucune sélectivité, sont représentés en fonction du DP sur la Figure 38. On constate que pour une membrane donnée, les taux de rétention des fructanes sont d'autant plus élevés que leur degré de polymérisation est grand. Mais ces taux de rétention ne sont pas toujours cohérents avec les valeurs du seuil de coupure données par les fournisseurs.

En effet, les membranes Millipore 10 kDa-CR et  $\alpha$ -Laval 10 kDa-PES donnent des taux de rétention supérieurs à ceux de la membrane Osmonic 8kDa-PA, elle-même plus rétentive que la membrane Koch 5 kDa-PES. De telles différences qui ne sont pas nécessairement liées au colmatage, ont déjà été rapportées dans la littérature (Platt *et al.* 2002; Hilal *et al.* 2007). Ainsi il a été montré que des membranes à base de CR commercialisées avec des seuils de coupure nominaux de 5 et 10 kDa présentaient un seuil de coupure réel de 2,5 kDa (Platt *et al.* 2002). Ces différences dérivent en fait de la définition même du seuil de

coupure. Ce paramètre est non seulement dépendant de la membrane caractérisée mais aussi des solutés utilisés pour cette caractérisation.

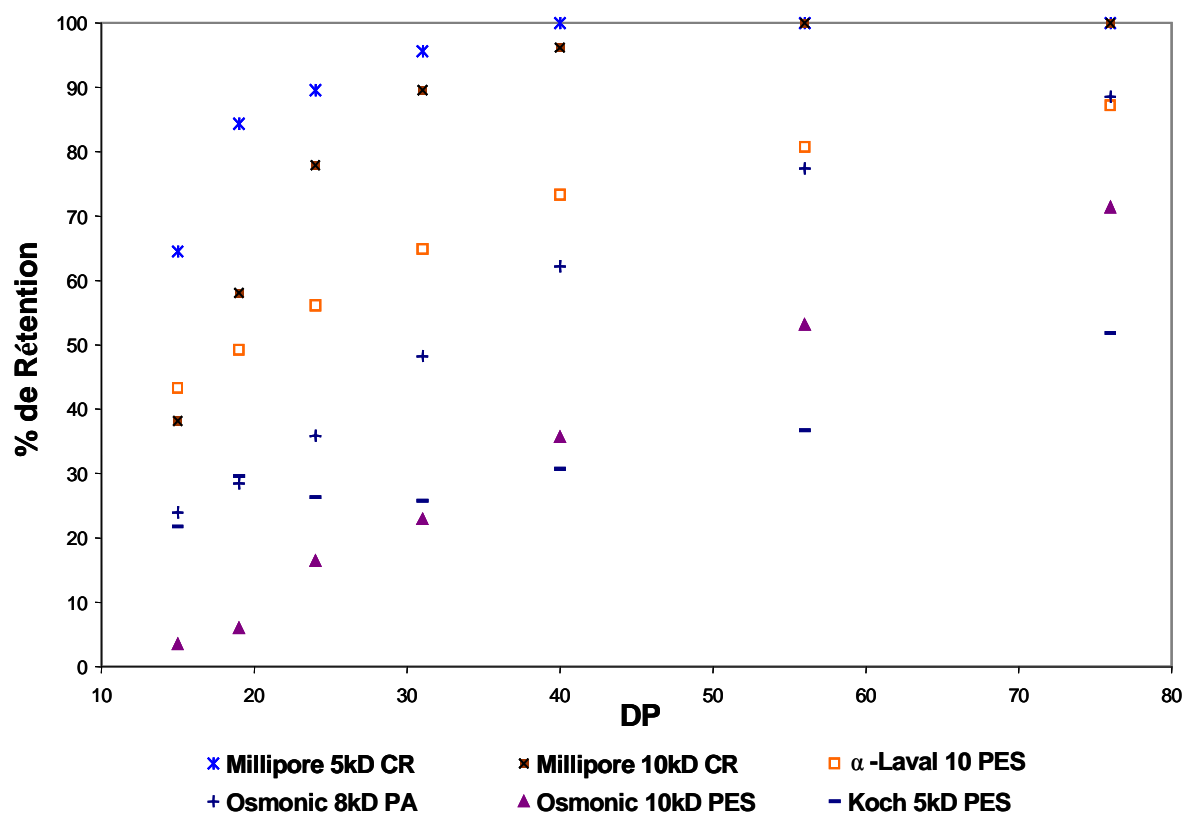


Figure 38 : Profils de rétention obtenus pour toutes les membranes organiques à 2 bar, 20°C, 350 rpm.

#### b. Pré-sélection de membranes inorganiques

En se basant sur les résultats obtenus lors des essais de filtration sur membranes organiques, les membranes inorganiques retenues pour cette étude présentent des seuils de coupure égaux respectivement à 3, 5, 8 et 15 kDa et proviennent toutes du même fournisseur (Tami Industrie). En raison de leur configuration tubulaire, ces membranes n'ont pu être testées que sur un petit module de filtration tangentielle. Ceci permet de se rapprocher des conditions de fonctionnement industrielles puisqu'il est possible grâce au recyclage du perméat et du rétentat de simuler des conditions de fonctionnement continu.

Cependant du fait de l'importance du volume mort du pilote (1,5 L) et de la faible surface membranaire disponible (155 cm<sup>2</sup>), il n'a pas été possible dans le cadre de cette étape de pré-sélection, d'étudier l'évolution du flux de perméation en fonction de la concentration. Par conséquent, pour évaluer les performances de ces quatre membranes céramiques, seule

l'incidence de la pression transmembranaire a été étudiée lors de la filtration d'une solution à 2 % d'agavines. La vitesse tangentielle et la température ont été maintenues constantes et égales à  $3 \text{ m.s}^{-1}$  et  $20^\circ\text{C}$  respectivement. Pour simuler les conditions de fonctionnement continu, perméat et rétentat ont été recyclés, le FRV a donc été maintenu égal à 1.

Les valeurs des flux obtenus en fonction de la pression sont présentées sur la Figure 39. Ces valeurs correspondent au flux moyen mesuré pendant 30 minutes après stabilisation. Il faut préciser que cette stabilisation est atteinte très rapidement (de l'ordre de 15 minutes maximum après le début de la filtration) et ce, quelles que soient la pression et la membrane considérées.

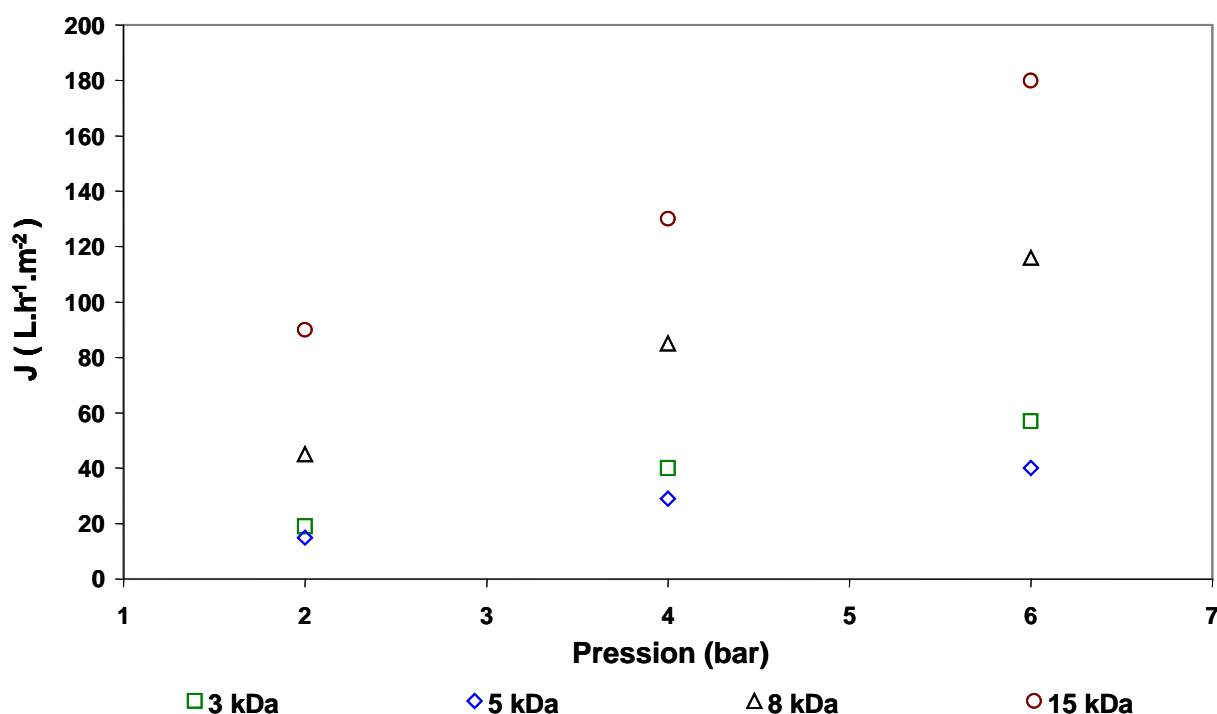


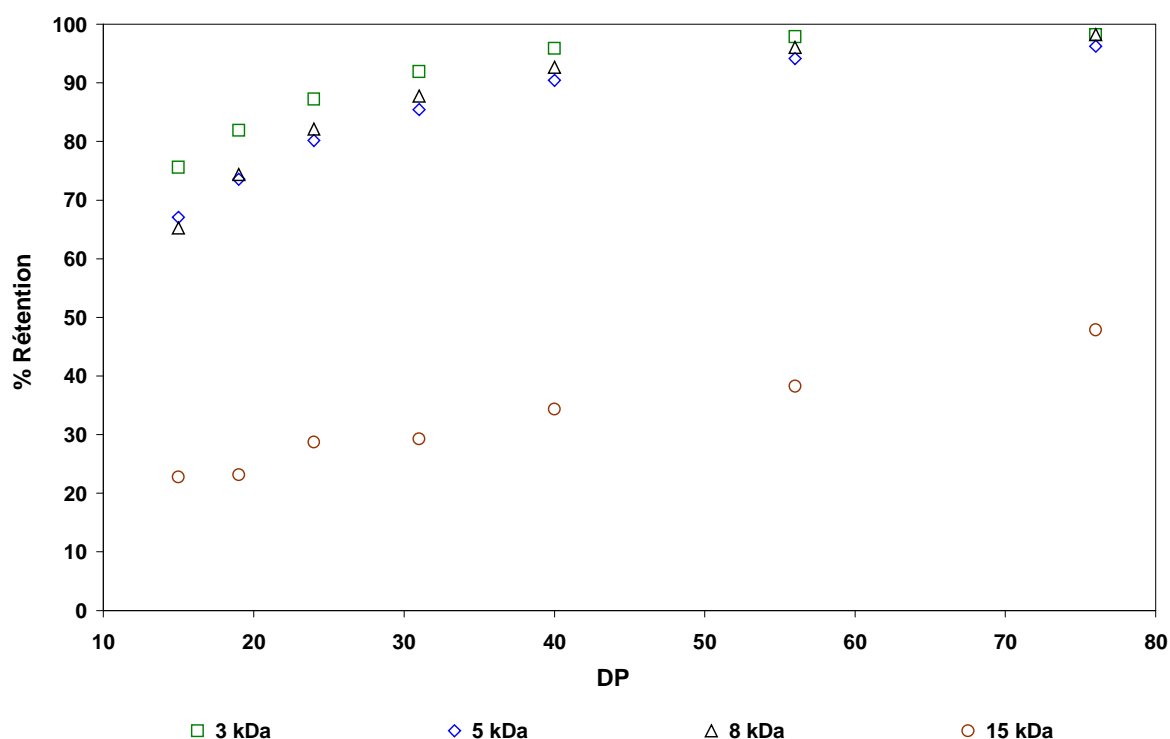
Figure 39 : Flux de perméation des membranes céramiques Tami en fonction de la pression transmembranaire, obtenus lors de la filtration d'une solution à 2% d'agavines (FRV 1,  $20^\circ\text{C}$ ,  $3 \text{ m.s}^{-1}$ ).

On constate d'après les valeurs reportées sur ce graphe, que quelle que soit la membrane considérée, les flux augmentent avec la pression transmembranaire appliquée. Toutefois, ces augmentations ne suivent pas la loi de Darcy, mettant ainsi en évidence l'existence de phénomènes de colmatage. Concernant l'impact du seuil de coupure sur la valeur du flux de perméation, on constate que globalement, ces dernières sont d'autant plus élevées que le seuil de coupure est élevé. Toutefois, cette observation n'est pas vérifiée pour la membrane 5 kDa. Les valeurs de flux sont identiques voir légèrement inférieures à celles



mesurées avec la membrane 3 kDa. Cela est sans doute dû à la mise en place d'un colmatage plus important sur la membrane 5kDa par rapport à la 3kDa. En effet, la comparaison des perméabilités à l'eau avant et après filtration de la solution met en évidence un % de colmatage irréversible plus important pour la membrane 5 kDa (51%) par rapport à la membrane 3 kDa (38%). Cette valeur est respectivement égale à 21% et 54% pour les membranes 8 et 15 kDa.

Pour comparer la sélectivité de ces 4 membranes, les profils de rétention des fructanes en fonction de leur DP, obtenus lors des filtrations réalisées avec une pression transmembranaire de 2 bar sont présentés sur la Figure 40.



**Figure 40 : Profils de rétention des fructanes pour les membranes céramiques Tami, en fonction de leur DP, obtenus lors de la filtration d'une solution à 2% d'agavines (FRV 1, 2 bar, 20°C, 3 m.s<sup>-1</sup>).**

D'après cette figure, il n'existe que peu de différences de sélectivité entre les membranes Tami 3, 5 et 8 kDa. La membrane 3 kDa est légèrement plus sélective. Elle retient un peu plus les fructanes de DP inférieurs à 30 et son seuil de coupure réel peut être estimé à 5 kDa ce qui n'est pas très différent de la valeur attendue. Dans le cas des membranes 5 et 8 kDa, les profils de rétention sont quasiment identiques et leur seuil de coupure réel peut être estimé à 6,5 kDa. Comme ces deux membranes ont une perméabilité à l'eau différente (respectivement 34 et 23 L.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup>.bar<sup>-1</sup> pour la membrane 8 kDa et la membrane 5 kDa), leurs

différences de performances en terme de flux s'expliquent par une différence de résistance membranaire et donc une différence de structure de leur couche active. Par contre, il est probable que leur sélectivité identique résulte de la mise en place d'un colmatage de surface à peu près similaire, d'où des rétentions voisines.

Au terme de ces essais de pré-sélection au cours desquels 9 membranes organiques et 4 membranes inorganiques ont été testées, nous avons acquis les informations nécessaires qui vont nous permettre, au cours de l'étape suivante, de choisir la ou les membranes adéquates pour atteindre nos objectifs à savoir la préparation sur la base de leur degré de polymérisation moyen, de différentes fractions de fructanes à partir du jus d'extraction des cœurs d'agaves.

## 2. Sélection des membranes

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre 1.III de cette thèse, les performances d'une membrane de filtration peuvent être évaluées à partir de deux paramètres rappelés ci-dessous.

**Le flux de perméat**, c'est à dire la vitesse à laquelle va s'effectuer la filtration et le procédé dans son ensemble si on a choisi de travailler en continu. Sachant que pour des grosses installations, maximiser les flux de perméat permet de minimiser significativement les coûts de fonctionnement. Par conséquent, il est nécessaire de définir un flux de perméat minimal  $J_{lim}$  en-dessous duquel l'opération de filtration n'est pas valable.

**La sélectivité** exprimée en terme **de rétention** ou encore **de transmission** des **molécules d'intérêt** selon que ces dernières se retrouvent dans le rétentat ou le perméat. Ce facteur est primordial en industries chimique ou pharmaceutique où la pureté des produits conditionne leur coût. Là encore, selon le cahier des charges de l'industriel, on parle de sélectivité limite ou  $\gamma_{lim}$  exprimée dans le cadre de cette thèse, en pourcentage de transmission ou de rétention selon les objectifs de l'étape étudiée.

Il est donc nécessaire d'optimiser le flux de perméat et la sélectivité selon la solution à filtrer et l'objectif à atteindre. Généralement, pour optimiser ces 2 paramètres, il est nécessaire de faire des compromis. Il faut définir le couple (flux, sélectivité) pour lequel un niveau de séparation suffisant est atteint dans des conditions de flux acceptables sur le plan économique. Pour faciliter le choix de ce couple, on représente généralement la sélectivité en

fonction du flux pour les différentes membranes testées (cf Figure 41) et sur le diagramme obtenu, on retrouve les 4 zones décrites ci-après. .

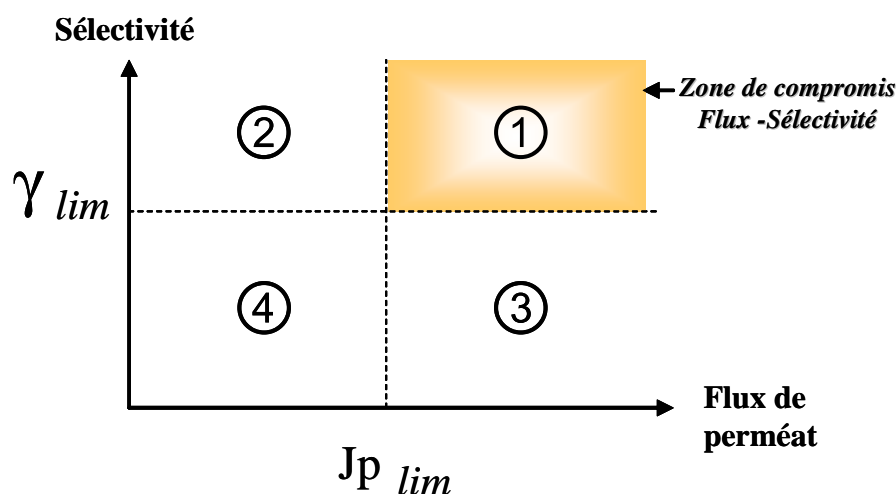


Figure 41 : Représentation de la sélectivité en fonction du flux de perméation.

Zone 1 : Elle correspond aux membranes satisfaisant à la fois les conditions de flux de perméat et de sélectivité.

Zone 2 : Lorsqu'une membrane se trouve dans cette zone, ses performances en terme de flux de perméat sont trop faibles pour satisfaire les contraintes économiques.

Zone 3 : On y retrouve les membranes dont la sélectivité n'est pas satisfaisante pour assurer une bonne séparation.

Zone 4 : Les membranes se trouvant dans cette zone ne présentent aucun intérêt pour l'opération définie.

Dans notre cas, du fait des conditions expérimentales différentes (filtration frontale/tangentielle), selon la nature des membranes testées, ce bilan est bien évidemment délicat. Afin d'avoir tout de même des éléments de comparaison et de pouvoir construire un graphe de flux-sélectivité pertinent, nous avons reporté pour les membranes organiques testées en filtration frontale, la valeur du débit initial mesuré à FRV de 1,05. De même, pour les membranes inorganiques testées en filtration tangentielle, n'ont été prises en compte que les valeurs des rétentions à 2 bar, c'est à dire dans les conditions de pression fixées en filtration frontale.

Comme nous l'avons vu plus haut (cf Figure 33), nous envisageons, pour atteindre notre objectif de fractionnement et purification des fructanes d'agaves, plusieurs étapes que nous allons examiner successivement ci-après.

a. Etape de clarification

Cette première étape a pour objectif principal d'éliminer tous les composés de haut poids moléculaire présents dans le jus brut tout en laissant le maximum de fructanes traverser la membrane. Par conséquent nous avons choisi, pour optimiser le choix de la membrane de clarification, de représenter le % de transmission des fructanes de DP inférieur à 60 en fonction du flux de perméation. Pour être retenue, une membrane devra présenter un taux de transmission de cette fraction supérieur à 60%. De plus, comme d'après la littérature, un flux de perméat supérieur à  $30 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$  est considéré comme acceptable pour un procédé de clarification en filtration tangentielle (Abreu *et al.* 2005), la membrane sélectionnée devra répondre à ce critère.

D'après la Figure 42, on constate que seules 5 membranes se trouvent dans la zone 1 du diagramme «compromis flux-sélectivité» à savoir les membranes Koch 5 kDa-PES, Koch, Millipore, et Orélis 10 kDa-PES et la membrane Tami 15 kDa.

La membrane Millipore 10 kDa-PES apparaît comme la plus performante mais nous avons vu précédemment que pour cette membrane, les flux de perméation chutaient très rapidement avec l'augmentation de la concentration. Nous avons noté une perte de flux initiale supérieure à 40%. Par conséquent, pour la suite de notre étude, nous avons sélectionné la membrane Tami 15 kDa qui offre le meilleur compromis (flux, sélectivité) et qui, de part sa nature inorganique, présente des propriétés intéressantes pour traiter des produits biologiques (résistance à la température et à la vapeur). La résistance thermique de ces membranes permettra de réaliser la filtration du jus dès son extraction sans qu'il soit nécessaire de le refroidir (la température d'extraction étant de l'ordre de 60 à 80°C).

Toutefois, cette étude étant réalisée sur une solution modèle préparée à partir d'une poudre d'agavines pré-purifiée, il n'y avait donc pas dans la solution filtrée tous les solutés présents dans le jus brut d'agaves. Or, certains de ces composés étant susceptibles d'être

colmatants, l'intérêt de clarifier le jus d'agave sur une membrane Tami 15 kDa devra être validé avec une solution réelle.

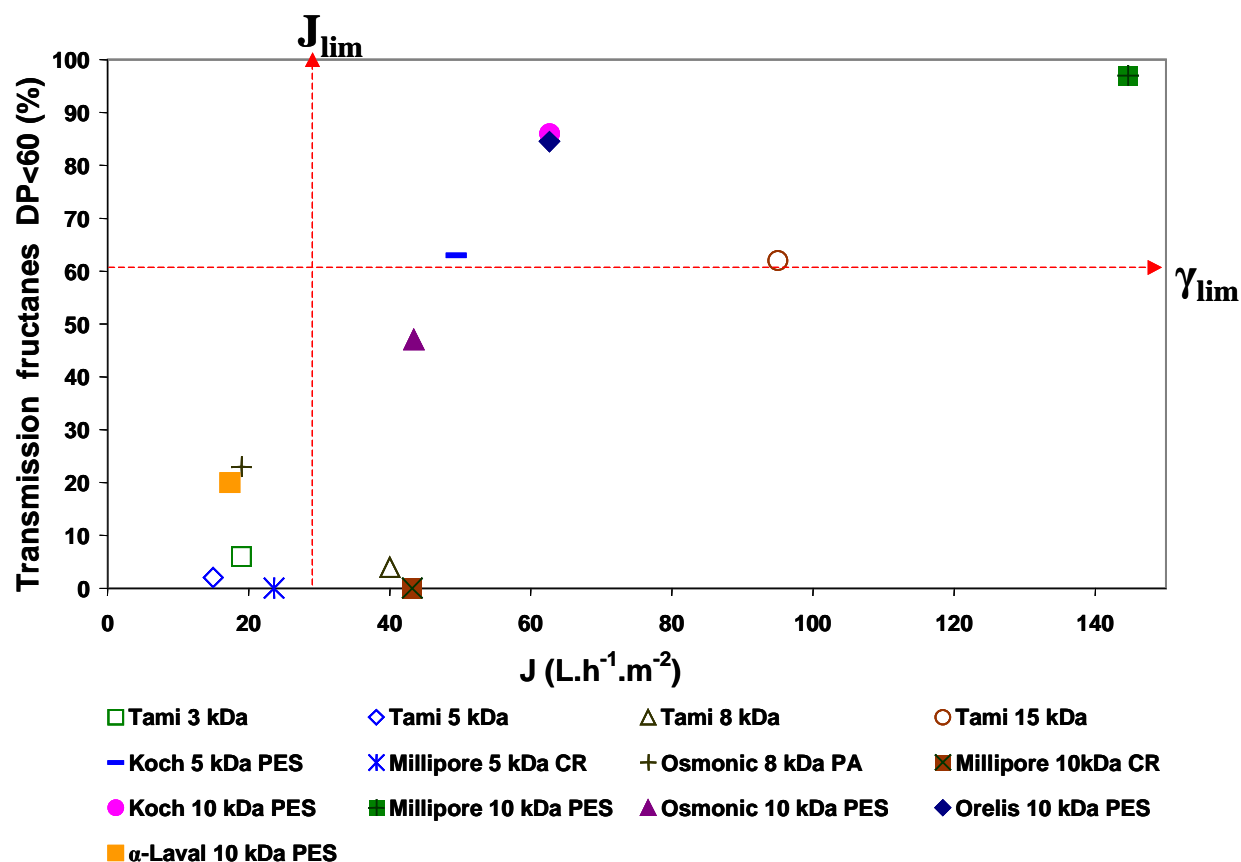


Figure 42 : Diagramme « compromis flux-selectivité » pour la sélection des membranes adaptées pour l'étape de clarification de la solution d'agavines.

#### b. Etape de concentration des fractions d'agavines de haut DP

L'objectif de cette deuxième étape est de récupérer les agavines de haut poids moléculaire. La membrane retenue devra présenter un taux de rétention supérieur à 70% pour les fructanes de DP supérieur à 16 d'une part et d'autre part autoriser comme précédemment des flux de perméation supérieurs à  $30 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ . Nous avons donc reporté dans la Figure 43 les taux de rétention des fractions d'agavines de DP compris entre 16 et 40 en fonction des flux de perméation pour les différentes membranes pré-sélectionnées.

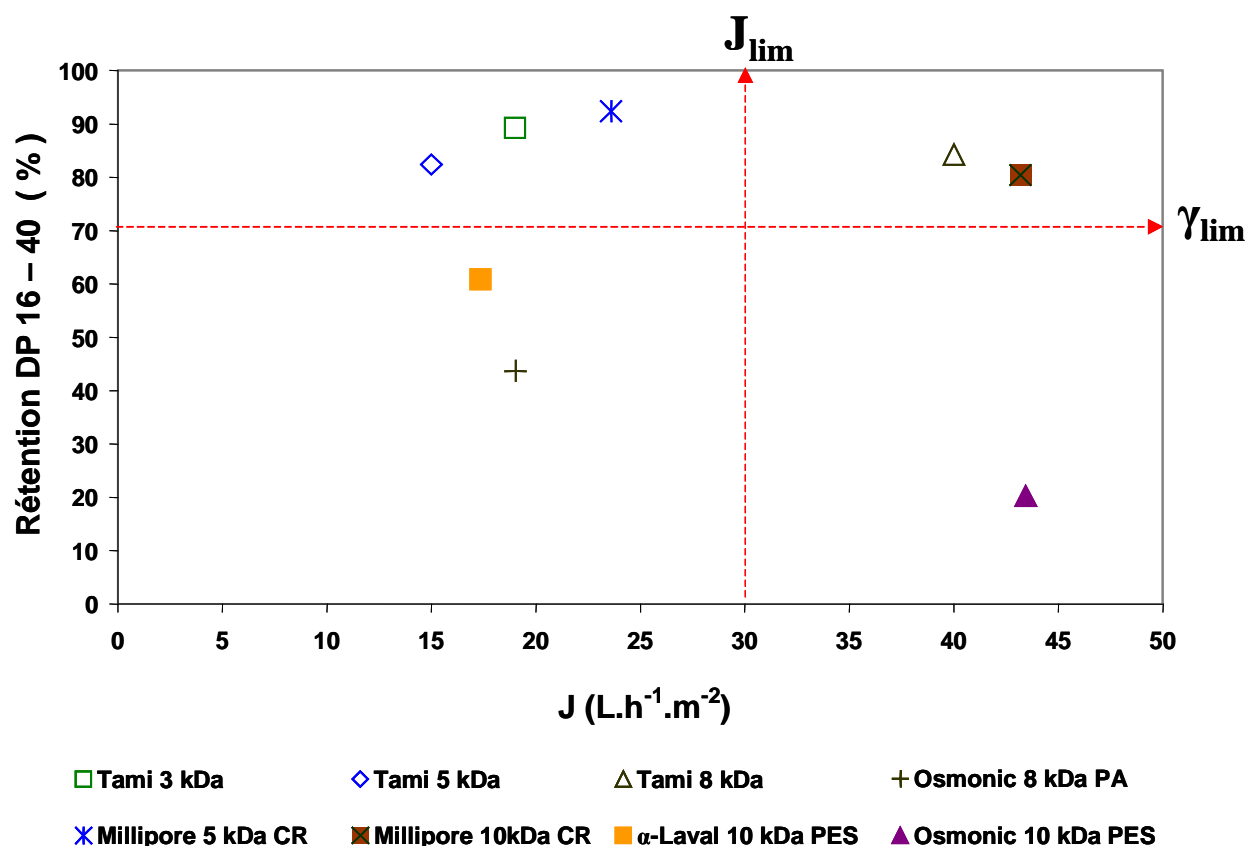


Figure 43 : Diagramme « Compromis flux-selectivité » pour la sélection des membranes adaptées à l'étape de concentration des agavines de hauts DP.

D'après cette figure, on constate que seules 2 membranes se trouvent dans la zone d'intérêt : la membrane Tami 8 kDa et la membrane Millipore 10 kDa-CR. De plus ces 2 membranes ont des performances très proches l'une de l'autre à savoir un taux de rétention de l'ordre de 80% et des flux compris entre 40 et 45 L.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup>. Toutefois, d'après les premiers essais réalisés, la membrane Millipore 10 kDa-CR semble se colmater moins facilement que la membrane Tami 8 kDa. Le colmatage irréversible estimé après filtration est de l'ordre de 4% avec cette membrane contre 21% dans le cas de la membrane Tami 8 kDa. Concernant la résistance thermique, la membrane Tami 8kDa est certes plus résistante mais la membrane Millipore 10 kDa-CR résiste parfaitement aux températures de l'ordre de 50°C ce qui devrait être la valeur de la température du perméat obtenu à l'issue de l'étape de clarification.

La membrane Millipore 10 kDa-CR a donc été retenue pour atteindre l'objectif fixé pour cette étape.

c. Etape de concentration des fractions d'agavines de DP intermédiaire

A l'issue de l'étape précédente, le perméat obtenu contient principalement des fructanes de DP inférieur à 20. L'objectif de cette nouvelle étape est de fractionner ce perméat en 2 solutions, le rétentat enrichi en fructanes de DP supérieurs à 10 et le perméat ne renfermant que des fructanes de DP inférieur à 10 encore appelés fructo-oligosaccharides ou FOS. La membrane sélectionnée pour répondre à cet objectif devra retenir à 100% les fructanes de DP supérieur ou égal à 10 et présenter le flux de perméation le plus élevé possible. Aucune des membranes testées précédemment ne répond à cet objectif. Toutefois, ces essais nous ont permis de conclure que parmi les membranes polymères, les membranes à base de CR semblent plus adaptées à la filtration de fructanes. A seuil de coupure équivalent, ces membranes présentent moins d'interactions avec les polysaccharides. Les taux de colmatage irréversible observés sur ce type de membranes sont toujours très faibles (<10%).

Nous avons donc décidé pour atteindre l'objectif fixé de tester deux membranes de seuil de coupure 1kDa : une membrane à base CR fournie par la société Millipore et une membrane céramique fournie par la société Pall-Exekia. Comme nous ne disposions pas d'un volume suffisant de perméat issu d'une filtration sur la membrane 10 kDa, ces essais comparatifs ont été réalisés sur du perméat issu d'une filtration sur la membrane Tami 15 kDa. On rappelle que, compte tenu de leur configuration respective, la membrane Millipore 1 kDa-CR a été testée en filtration frontale dans une cellule Amicon® et la membrane Pall-Exekia 1 kDa a été testée en filtration tangentielle. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le Tableau 19.

**Tableau 19 : Comparaison des performances de 2 membranes de seuil de coupure 1kDa pour la séparation des fructanes de DP intermédiaire à partir d'une solution d'agavines clarifiée. (Conditions d'opérateurs : 4 bar, 20°C, \* 3 m/s, \*\* 350 rpm).**

<b>Membranes</b>	<b>1 kDa</b>	<b>Flux ( L.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup> )</b>	<b>DP retenus à 100%</b>	<b>Colmatage ( % )</b>
<b>Pall Exekia</b>	<b>*</b>	<b>15 ± 1</b>	<b>&gt; 40</b>	<b>62</b>
<b>Millipore</b>	<b>CR **</b>	<b>18 ± 1</b>	<b>&gt; 12</b>	<b>0</b>

On constate que la membrane Millipore 1kDa-CR est plus perméable que la membrane Pall-Exekia 1kDa. Les moindres performances de la membrane céramique

s'expliquent par la mise en place d'un colmatage irréversible important (62%) vraisemblablement dû aux interactions entre les constituants de la solution et le matériau membranaire. La membrane polymère quant à elle, ne se colmate pratiquement pas, la perméabilité à l'eau après filtration de la solution d'agavines est identique à celle mesurée sur la membrane propre. De plus, le seuil de coupure apparent de la membrane polymère est plus faible que celui de la membrane céramique. En effet, seuls les fructanes de DP supérieurs à 40 sont retenus à 100% par la membrane Pall-Exekia, la membrane Millipore retenant quant à elle, 100% des fructanes de DP supérieur à 12. Ces observations nous conduisent donc à retenir la membrane à base de CR pour la troisième étape de notre procédé de purification.

d. Etape de purification des FOS issus de jus d'agaves

Le perméat issu de l'étape précédente contient en principe essentiellement des FOS dont le DP est compris entre 3 et 10. Toutefois, il va contenir également des monosaccharides (glucose, fructose) et des disaccharides (saccharose). Or des études (Goulas *et al.* 2002; Kamada *et al.* 2002; Li *et al.* 2004) ont montré que la présence de ces constituants limitait l'intérêt nutritionnel et les applications des FOS obtenus. Ces constituants doivent donc être éliminés. Pour cela, une étape de nanofiltration semble être adaptée. En effet, Kamada *et al.* (2002) ont déjà étudié les potentialités de membranes de nanofiltration (membranes G5 et G10 Desalination System) pour éliminer le saccharose et les monosaccharides présents dans le perméat d'une solution modèle d'inuline de chicorée. De leur côté, Li *et al.* (Li *et al.* 2004; Li *et al.* 2005) ont étudié l'intérêt des membranes Osmonic GH et GK pour la purification des FOS d'un sirop de fructo-oligosaccharides.

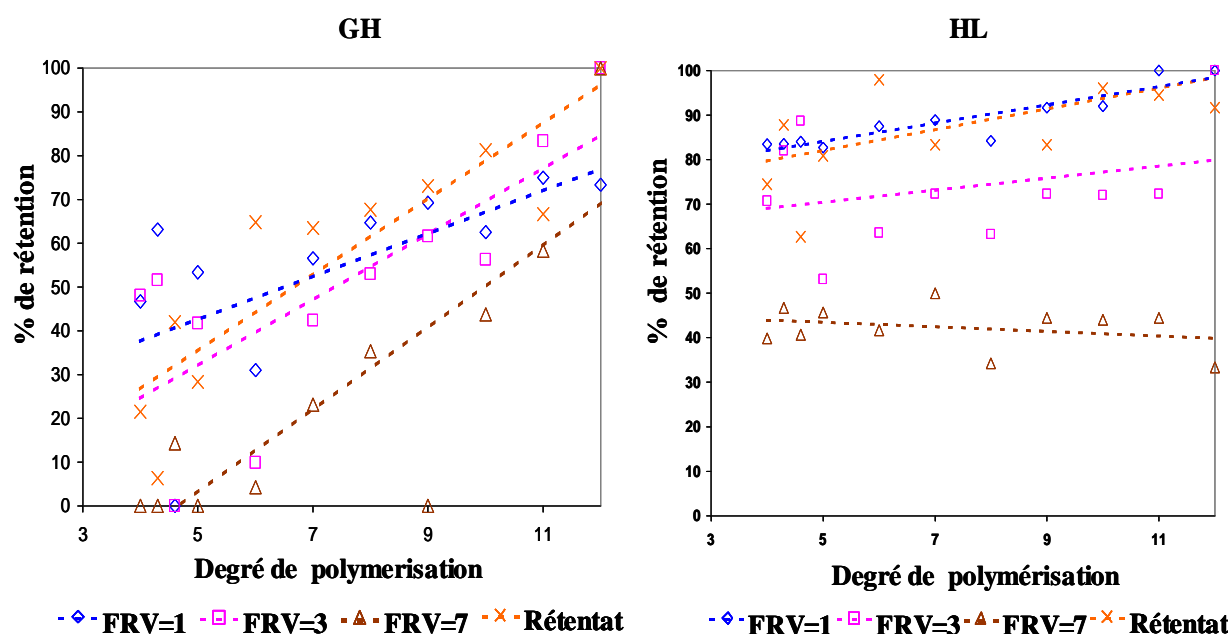
Lors de notre étude, nous avons pré-sélectionné deux membranes polymères commercialisées par la société Osmonic, à savoir la membrane Osmonic GE Sepa™ **GH** (MWCO 1 kDa-PEG) et la membrane Osmonic Desal **HL** (MWCO 0,15-0,3 kDa). Ces deux membranes sont constituées d'un support macroporeux en polyester sur lequel est déposé une première couche en polysulfone, puis une seconde couche dont la nature n'est pas précisée et enfin l'ensemble est recouvert d'un mince film en polyamide. Pour les départager, nous avons étudié leurs performances lors d'essais de filtration de la solution d'agavines clarifiée réalisés en cellule de filtration frontale Amicon®. Les valeurs des flux de perméation obtenues sont rapportées dans le Tableau 20.



**Tableau 20 :** Comparaison des performances des membranes Osmonic GE Sepa™ GH et Osmonic Desal HL, lors de la purification de FOS à partir d'une solution d'agavines clarifiée. (Conditions d'opérateurs : 4 bar, 20°C, 350 rpm) .

Membranes	UF -NF	Flux (L.h <sup>-1</sup> .m <sup>-2</sup> )	Colmatage ( % )
Osmonics	GH	14	21
Osmonics	HL	40	10

D'après les valeurs de flux mesurées, la membrane Osmonic Desal HL semble la plus performante, le flux égal à 40 L.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup> est presque 3 fois plus élevé que celui obtenu avec la membrane Osmonic GE Sepa™ GH et le % de colmatage réversible est 2 fois plus faible (10% au lieu de 21%). Toutefois, au regard des taux de rétention rapportés sur la Figure 44, cette membrane n'est peut être pas aussi intéressante qu'il n'y paraît. En effet, d'après l'observation du profil de rétention, on constate que cette membrane retient le saccharose dans les mêmes proportions que les FOS de DP supérieurs, ceci quelle que soit la concentration de la solution. Il ne sera donc pas possible d'éliminer le saccharose du mélange en utilisant cette membrane.



**Figure 44 :** Comparaison des profils de rétention obtenus lors de la filtration d'une solution d'agavine purifiée (FRUCTAGAVE PR-75) sur des membranes Osmonic GE Sepa™ GH et Osmonic Desal HL.

En ce qui concerne la membrane Osmonic GE Sepa™ GH, les résultats sont différents. On constate une rétention différentielle en fonction du DP et cet effet est accentué avec l'augmentation de la concentration (cf Figure 44). On pourra donc, en jouant sur ce paramètre, éliminer les monosaccharides et le saccharose du mélange. Cette membrane qui présente en fait des propriétés de transfert proches de celles des membranes d'ultrafiltration basse, est donc retenue pour la dernière étape de notre procédé.

### 3. Conclusions

Au terme de cette étape et sur la base des résultats obtenus lors des essais réalisés sur une solution modèle préparée à partir de poudre d'agavines (FRUCTAGAVE PR-75), nous pouvons proposer pour le fractionnement des fructanes d'agave, le schéma de procédé représenté dans la Figure 45.

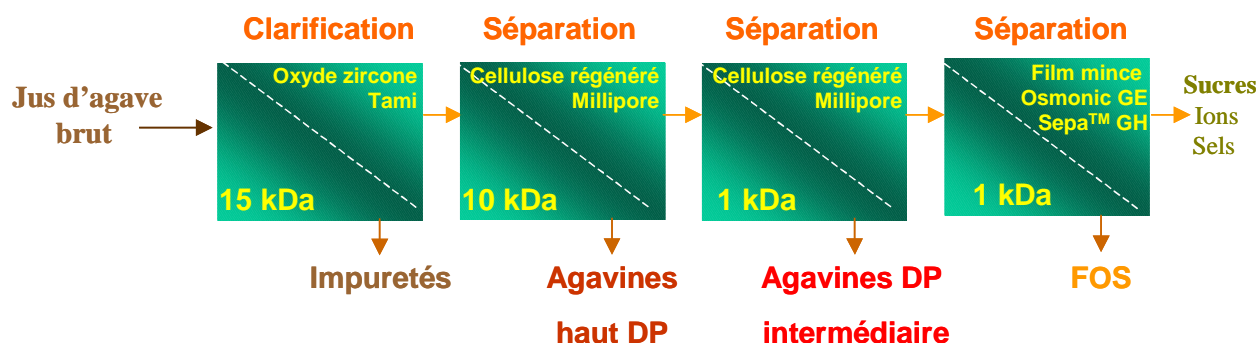


Figure 45 : Schéma du procédé de clarification et séparation des fructanes à partir de jus d'Agave tequilana en poudre..

Il est ainsi prévu 4 étapes de séparation membranaire mettant en œuvre successivement une membrane inorganique de seuil de coupure 15 kDa (membrane Tami), puis 2 membranes à base de CR de seuil de coupure respectifs 10 kDa et 1 kDa (membranes Millipore) et pour finir, une membrane d'ultrafiltration basse (membrane Osmonic GE Sepa™ GH).

Avant de valider ce procédé par des expériences sur solutions réelles, nous allons dans la partie suivante, valider sur solution modèle la pertinence de l'enchaînement de ces étapes de filtration.

## C. VALIDATION DU PROCEDE SUR SOLUTION MODELE

La validation sur solution modèle du procédé dans son ensemble s'avère indispensable car l'étude précédente a été réalisée en utilisant comme solution d'alimentation soit une solution d'agavines à 2% (cas des étapes de filtration sur les membranes Tami 15 kDa et Millipore 10 kDa-CR), soit du perméat (solution d'agavines clarifiée) obtenu lors de la filtration d'une solution d'agavines à 2% sur la membrane Tami 15 kDa (cas des étapes de filtration sur les membranes Millipore 1 kDa-CR et Osmonic GE Sepa™ GH). Or, il est connu que les performances d'une étape de filtration dépendent de la composition de la solution d'alimentation. Comme dans notre cas, le perméat d'une étape est également la solution d'alimentation de l'étape suivante, nous allons étudier l'incidence des paramètres opératoires sur le flux d'une part et sur la composition du perméat des premières étapes de filtration d'autre part.

Par manque de temps, seule l'étape de clarification qui détermine la composition réelle et les débits de la solution d'alimentation des étapes ultérieures, sera étudiée de façon plus approfondie, les étapes ultérieures ne seront mises en œuvre que pour valider l'intérêt du procédé.

### 1. Etude de l'étape de clarification

#### a. Incidence des paramètres opératoires

Les performances d'une étape de filtration sur membranes sont généralement dépendantes des paramètres opératoires à savoir: la vitesse de circulation, la pression transmembranaire, la température et enfin la concentration. Afin de choisir les conditions les plus adéquates pour cette étape, nous avons fait varier successivement un de ces paramètres opératoires, les autres paramètres étant maintenus constants et égaux respectivement à 20°C, 2 bar, 3 m.s<sup>-1</sup> et la concentration de la solution égale à 2%. Les résultats obtenus sont rapportés ci-après.

- **Effet de la vitesse de circulation de fluide**

En général, lors de la filtration tangentielle de certaines solutions biologiques, l'augmentation de la vitesse de circulation permet d'améliorer la perméabilité en raison des

conditions hydrodynamiques qui évitent le dépôt des molécules à la surface et limitent ainsi le colmatage de la membrane (He *et al.* 2007; Boissier *et al.* 2008). Dans notre cas, les résultats rapportés dans le Tableau 21 montrent que le flux, de l'ordre de  $80 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ , reste très stable pour des valeurs de vitesse comprises entre 2 et  $4 \text{ m.s}^{-1}$ . Ce résultat n'est pas surprenant car dans ce domaine de vitesse, la valeur du nombre de Reynolds est toujours supérieure à 2500 (elle varie respectivement entre 7000 et 17500). Les conditions d'écoulement sont donc turbulentes quelle que soit la vitesse. Par conséquent, une augmentation de ce paramètre n'aura pas d'incidence sur les épaisseurs des couches limites et donc sur le flux. Toutefois, on note qu'au-delà de  $4 \text{ m.s}^{-1}$ , le flux a tendance à diminuer avec l'augmentation de la vitesse, les valeurs à  $5 \text{ m.s}^{-1}$  et  $5,2 \text{ m.s}^{-1}$  sont respectivement égales à 72 et  $65 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ .

**Tableau 21 : Evolution du flux de perméat en fonction de la vitesse tangentielle lors de la filtration d'une solution à 2% d'agavines, 2 bar, 20°C sur une membrane Tami 15kDa.**

Vitesse ( $\text{m.s}^{-1}$ )	2	3	4	5	5,2
Flux ( $\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ )	$75 \pm 4$	$80 \pm 4$	$78 \pm 1$	$72 \pm 1$	$65 \pm 1$

Ce résultat pourrait découler de la modification de la structure du dépôt de surface lors de l'augmentation des contraintes de cisaillement. En effet, nous avons vu lors des premiers essais que la filtration de la solution d'agavines sur la membrane Tami 15 kDa, entraînait l'établissement d'un colmatage irréversible important (perte de plus de 50% de la perméabilité à l'eau). Il est possible qu'une part de ce colmatage corresponde à une couche dynamique formée à la surface de la membrane. Or (Gumi *et al.* 2008) ont montré, lors de la filtration d'hexane sur une membrane hybride constituée par le dépôt dynamique d'une couche mixte (PEI/gélatine) à la surface d'une membrane céramique, que le flux diminuait avec l'augmentation de la vitesse. Ces auteurs ont montré que l'aspect de la couche de surface était différent selon les conditions de mise en œuvre (conditions laminaires ou turbulentes), laissant ainsi supposer des modifications structurales du dépôt à l'origine des modifications des propriétés de transfert.

Les profils de rétention des fructanes en fonction de leur DP sont rapportés sur la Figure 46. Nous constatons que l'augmentation de la vitesse tangentielle entraîne une augmentation de la rétention des fructanes et ce, d'autant plus que leur DP est élevé. La rétention des fructanes de

DP inférieur à 20 est quasiment inchangée alors que celle des fructanes de DP supérieur à 50 passe de 25% à plus de 50% lorsque la vitesse passe de 2 à 5 m.s<sup>-1</sup>. Cet accroissement de rétention résulte vraisemblablement de phénomènes de colmatage qui se traduisent également par une réduction du flux de perméation. Par conséquent, si nous souhaitons éliminer les composés de haut poids moléculaire, il est souhaitable de travailler aux plus hautes valeurs de la vitesse tangentielle.

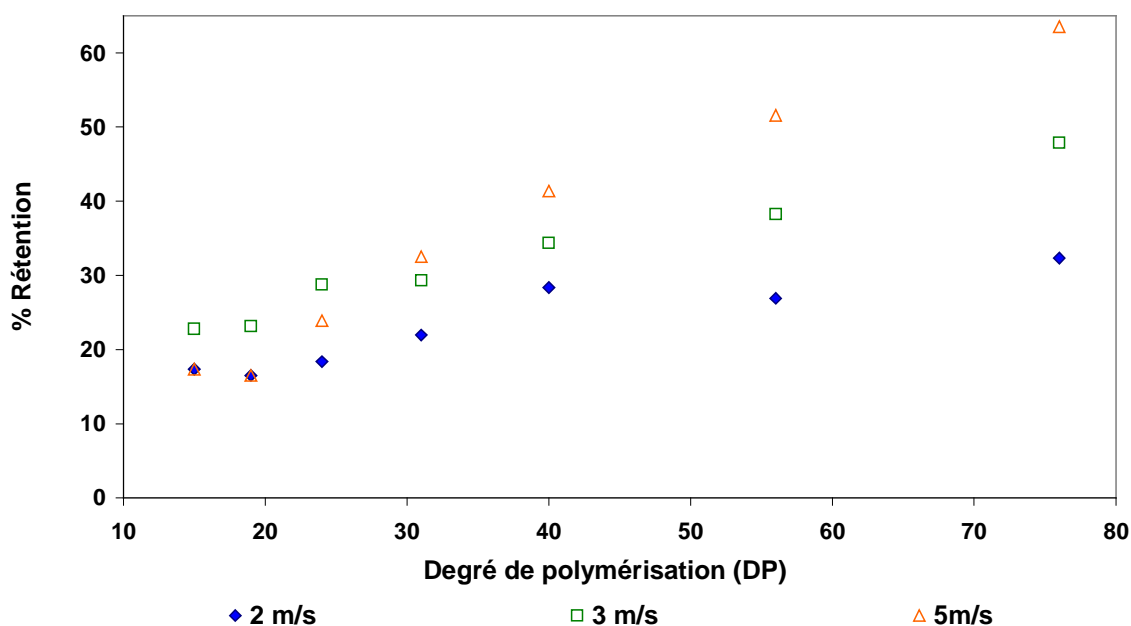


Figure 46 : Profils de rétention des fructanes en fonction de la vitesse tangentielle lors de la filtration d'une solution à 2% d'agavines 2 bar, 20°C sur une membrane Tami 15 kDa

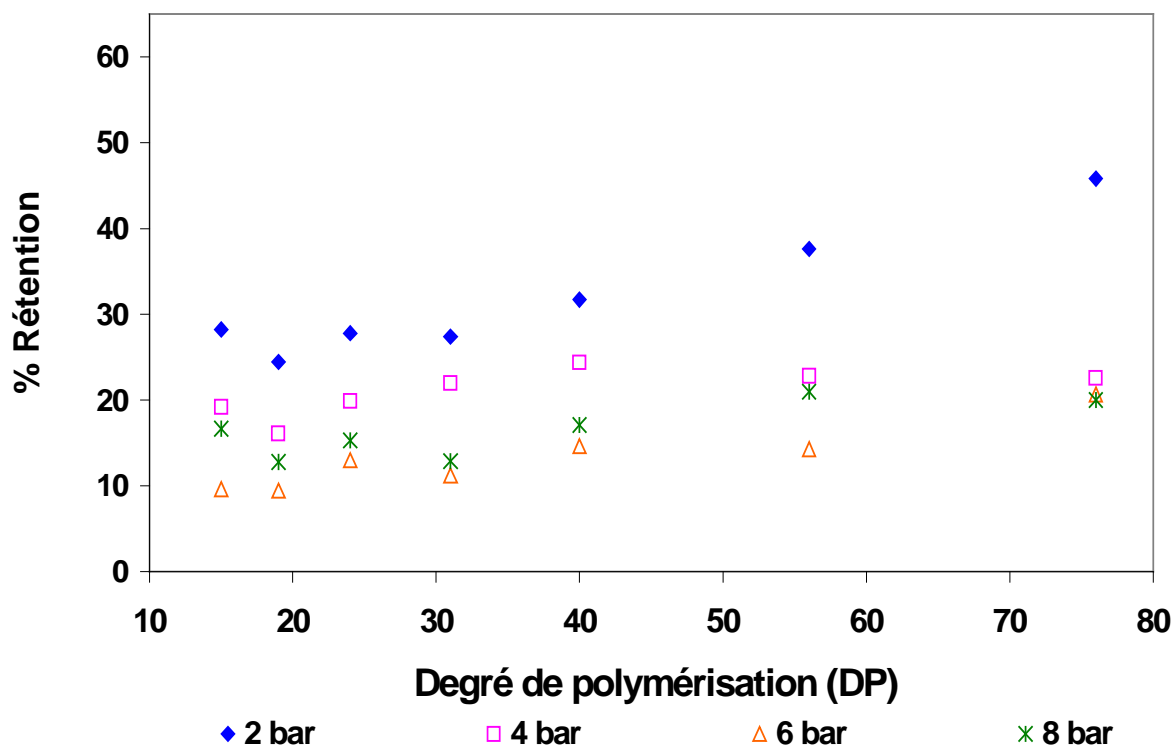
- **Effet de la pression**

L'incidence de la pression transmembranaire sur les valeurs du flux de perméation est rapportée dans le Tableau 22. On retrouve les résultats déjà rapportés sur la Figure 39 à savoir que les flux augmentent avec la pression entre 2 et 6 bar. Toutefois, cette augmentation ne suit pas parfaitement la loi de Darcy puisque le flux passe d'environ 80 L.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup> à 2 bar à 160 L.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup> à 6 bar. Au-delà de 6 bar, il ne sert à rien d'augmenter la pression, les valeurs du flux n'augmentent pas au contraire, elles semblent diminuer. Cette stabilisation témoigne de la mise en place d'un colmatage externe qui tend à s'accroître avec l'augmentation de la pression. Un comportement très similaire a été rapporté par He *et al.* (2007) lors de la clarification du jus de pomme.

**Tableau 22 : Evolution des flux de perméat avec la pression transmembranaire lors de la filtration d'une solution d'agavines 2 %,  $3\text{m.s}^{-1}$ ,  $20^{\circ}\text{C}$  sur une membrane Tami 15kDa**

Pression ( bar )	2	4	6	8
Flux ( $\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ )	$80 \pm 4$	$142 \pm 22$	$162 \pm 31$	$156 \pm 17$

La Figure 47, où sont rapportés les taux de rétention des fructanes en fonction de leur DP pour différentes valeurs de la pression transmembranaire, met en évidence qu'une augmentation de la pression réduit la capacité de la membrane à séparer les fructanes sur la base de leur DP. Au-delà de 4 bar, il n'y a plus de différence de rétention en fonction du DP. L'augmentation de la pression entraîne le passage en force des molécules de haut DP dont le taux de rétention chute respectivement de 40% à 20% lorsque la pression augmente de 2 à 4 bar.



**Figure 47 : Profils de rétention des fructanes en fonction de la pression transmembranaire lors de la filtration d'une solution à 2% d'agavines à  $3\text{m.s}^{-1}$ ,  $20^{\circ}\text{C}$  sur une membrane Tami 15 kDa.**

- **Effet de la température**

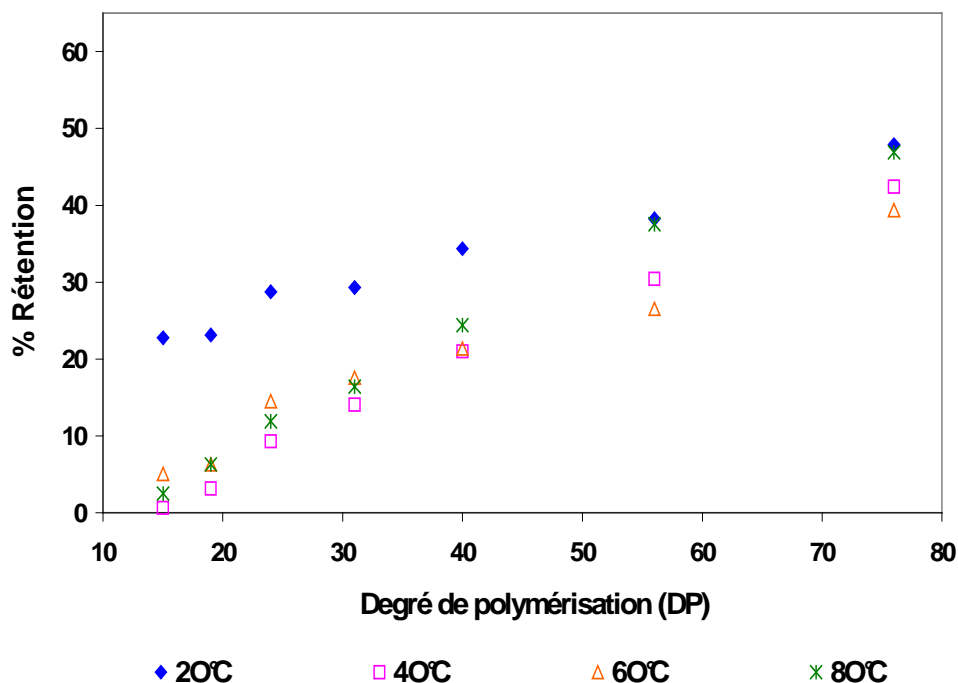
Comme on peut le voir dans Tableau 23, l'augmentation de la température améliore la perméabilité de la membrane. Ceci est dû aux effets positifs de ce paramètre sur les valeurs

de la viscosité d'une part et sur celles des coefficients de transfert de masse d'autre part. En effet, la chute de la viscosité et l'augmentation des coefficients de transfert liées à l'augmentation de la température diminuent les épaisseurs des couches limites et par voie de conséquence limitent leur impact sur le transfert de matière. Ces phénomènes ont déjà été rapportés dans la littérature notamment dans le cas de la clarification de jus de fruits (He *et al.* 2007).

**Tableau 23 : Evolution des flux de perméat avec la température lors de la filtration d'une solution d'agavines 2 %, 2 bar, 3m.s<sup>-1</sup> sur une membrane Tami 15kDa.**

Température (°C)	20	40	60	80
Flux ( L.h <sup>-1</sup> .m <sup>-2</sup> )	80 ± 4	125 ± 4	169 ± 6	231 ± 11

En ce qui concerne la rétention des fructanes, on constate d'après la Figure 48, qu'un accroissement de la température réduit la rétention des fructanes de faible DP. Ces derniers sont en effet, entraînés par convection avec le solvant. Cette rétention différentielle liée à l'augmentation de la température permet d'améliorer l'efficacité de la séparation.



**Figure 48 : Profils de rétention des fructanes en fonction de la température lors de la filtration d'une solution à 2% d'agavines à 2 bar et 3m.s<sup>-1</sup> sur une membrane Tami 15 kDa.**

- **Effet de la concentration de la solution d'alimentation (So)**

En raison de la faible surface membranaire disponible, il n'a pas été possible de suivre l'évolution du flux au cours de l'augmentation de la concentration de la solution. Nous avons donc démarré l'expérience par la filtration en mode fermé (avec recyclage du perméat et du rétentat) d'une solution à 30% d'agavines puis lorsque le flux était stable, de l'eau a été ajoutée de façon à obtenir une concentration plus faible. Cette opération a été répétée jusqu'à atteindre la concentration finale de 2 %. Les valeurs de flux obtenues sont consignées dans le Tableau 24.

**Tableau 24 : Evolution des flux de perméat avec la concentration lors de la filtration d'une solution d'agavines de moins en moins concentrée, 2 bar,  $3\text{m.s}^{-1}$ ,  $20^{\circ}\text{C}$  sur une membrane Tami 15kDa.**

<b>Concentration So ( %)</b>	<b>30</b>	<b>24</b>	<b>18</b>	<b>12</b>	<b>6</b>	<b>2</b>
<b>Flux ( <math>\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}</math> )</b>	<b><math>23 \pm 3</math></b>	<b><math>33 \pm 1</math></b>	<b><math>50 \pm 3</math></b>	<b><math>74 \pm 2</math></b>	<b><math>98 \pm 3</math></b>	<b><math>127 \pm 5</math></b>

Comme, on pouvait s'y attendre, les flux sont d'autant plus élevés que la concentration est faible. Cela confirme les résultats rapportés dans la littérature à savoir qu'à forte concentration, les phénomènes de polarisation sont plus accentués, le colmatage est plus important (Vladisavljevic *et al.* 2003; He *et al.* 2007). Toutefois, on observe un phénomène assez inhabituel. Le flux mesuré en fin d'expérience lorsque la concentration de la solution a atteint la valeur de 2%, est plus important que ceux mesurés précédemment, c'est-à-dire lors de la filtration directe d'une solution à 2% dans les mêmes conditions de vitesse, de température et de pression. Ici, le flux mesuré est de l'ordre de  $130 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$  contre  $80 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ , soit une augmentation de 60%. De plus, en fin d'expérience, le colmatage irréversible mesuré est plus faible de l'ordre de 40% contre 60 % mesuré dans les autres expériences. On peut supposer qu'à concentration élevée, la couche dynamique de surface se forme plus rapidement évitant ainsi le colmatage interne de la membrane elle-même. Dans ces conditions, les molécules dont la taille est voisine de celle des pores sont retenues en amont de la couche dynamique et ne peuvent donc pas bloquer l'entrée des pores. Au final, lorsque la concentration diminue, le flux augmente suite à la réduction des phénomènes de polarisation et se stabilise à une valeur plus élevée du fait de l'absence de colmatage interne. Comme nous ne possédions qu'une seule membrane, il ne nous a pas été possible de vérifier cette hypothèse par des observations en MEB.



Par ailleurs, il semble que les conditions d'élaboration de la couche dynamique modifient également sa structure. La couche élaborée lorsque l'on démarre l'expérience par la filtration d'une solution à 30% est moins resserrée que lorsque elle est établie au cours de la filtration d'une solution à 2%. Cela se remarque essentiellement au niveau de la rétention des fructanes de DP intermédiaire ( $DP < 30$ ) comme on peut le voir sur la Figure 49. Par exemple le taux de rétention des fructanes de DP 20 est ici égal à 10% alors que, lors des précédents essais, nous avons trouvé des taux de l'ordre de 20%. En ce qui concerne les fructanes de  $DP > 30$ , le profil obtenu ici avec la solution à 2% est très proche de ceux obtenus précédemment à cette même concentration et dans des conditions de vitesse, de température et de pression similaires. Enfin, on constate sur cette même figure, que les profils de rétention ne sont pas affectés significativement par la concentration de la solution d'alimentation mis à part le fait que la rétention est légèrement plus élevée (moins de 10% plus grande) lorsque la concentration est plus faible.

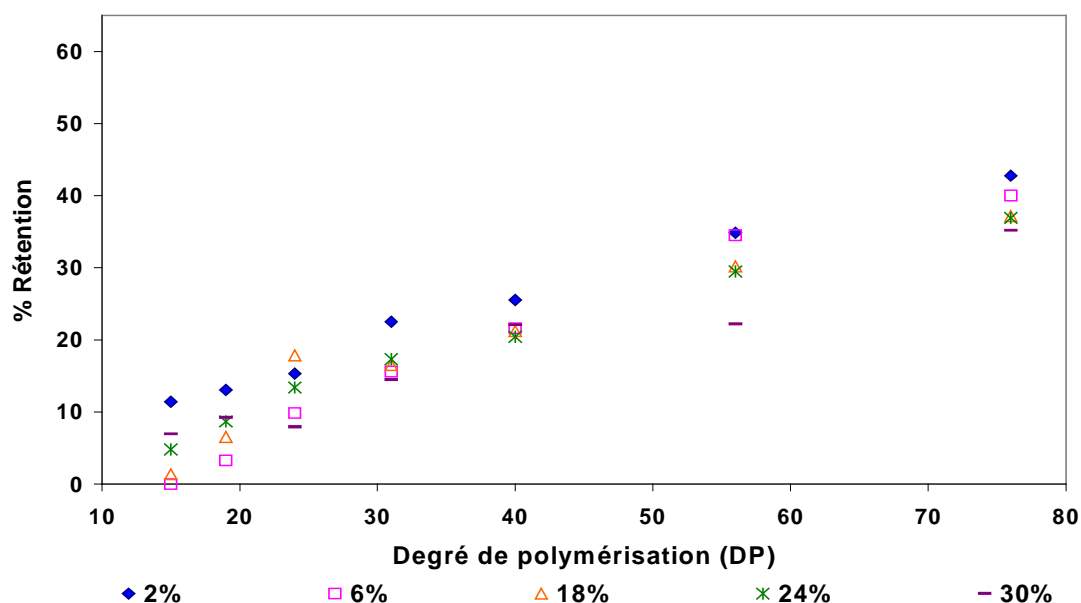


Figure 49 : Profils de rétention des fructanes en fonction de la concentration lors de la filtration d'une solution d'agavines de moins en moins concentrée à 2 bar,  $3\text{m.s}^{-1}$  et  $20^\circ\text{C}$ , sur une membrane Tami 15 kDa.

#### b. Choix des paramètres opératoires pour l'étape de clarification

Pour faciliter ce choix, l'ensemble des effets des différents paramètres opératoires sur le flux et la rétention est résumé dans le Tableau 25. Pour plus de pertinence, nous avons également choisi de considérer un autre paramètre à savoir, la sélectivité c'est-à-dire la capacité de séparation des agavines de différents DP, l'objectif étant de se placer dans les

conditions pour lesquelles on observe un maximum de différence de rétention entre les différentes fractions d'agavines.

**Tableau 25 : Impacts des conditions opératoires sur le flux, la rétention et la sélectivité lors de la filtration d'une solution d'agavines sur une membrane Tami 15 kDa.**

Variable	Valeurs testées	Flux	Rétention	Selectivité f (DP)
Vitesse (m.s <sup>-1</sup> )	2, 3, 4, <b>5</b>	~	↗	↗
Pression (bar)	<b>2</b> , 4, 6, 8	↗	↘	↘
Température (°C)	20, 40, <b>60</b> , 80	↗	↘	↗
Concentration (%)	2, 6, 12, <b>18</b> , 24, 30	↘	~	↗

Pour réaliser ce choix, il faut également rappeler que l'extraction du jus des cœurs d'agave est réalisée à des températures élevées de l'ordre de 80 °C, que ce jus présente un extrait sec soluble de l'ordre de 14 à 18 g/100g et est certainement plus riche en fructanes de haut poids moléculaire que la poudre d'agavine considérée. C'est pourquoi, nous avons donc décidé de travailler avec une solution à 20% et une température égale à 60°C, il ne sera ainsi pas nécessaire de diluer ni de refroidir le jus extrait lors de la mise en œuvre à l'échelle industrielle. De plus, l'augmentation de la température permettra de réduire l'impact négatif de la concentration sur les performances en terme de flux. Enfin, on observera une augmentation de la sélectivité, ces conditions de concentration favorisant la rétention des molécules de haut DP tout en laissant plus passer les fructanes de faible DP. Pour cette même raison, nous avons choisi de travailler à 5 m.s<sup>-1</sup> et à 2 bar.

c. Clarification d'une solution d'agavines (FRUCTAGAVE PR-95) à 20%

Le profil de filtration obtenu lors de la production de la solution d'agavines clarifiée est présenté sur la Figure 50. On constate que malgré une concentration élevée, le flux de filtration se maintient. On observe toutefois une réduction graduelle au cours de l'augmentation de la concentration. La perte de flux atteint 30% lorsque le FRV est égal à 2,5. De plus, le % de colmatage atteint en fin d'expérience (39%) est inférieur à celui mesuré lors des essais réalisés avec une solution à 2% mais est conforme à celui mesuré lors de l'étude de

l'incidence de la concentration. Cela confirme l'intérêt de travailler à concentration élevée pour limiter le colmatage interne des membranes.

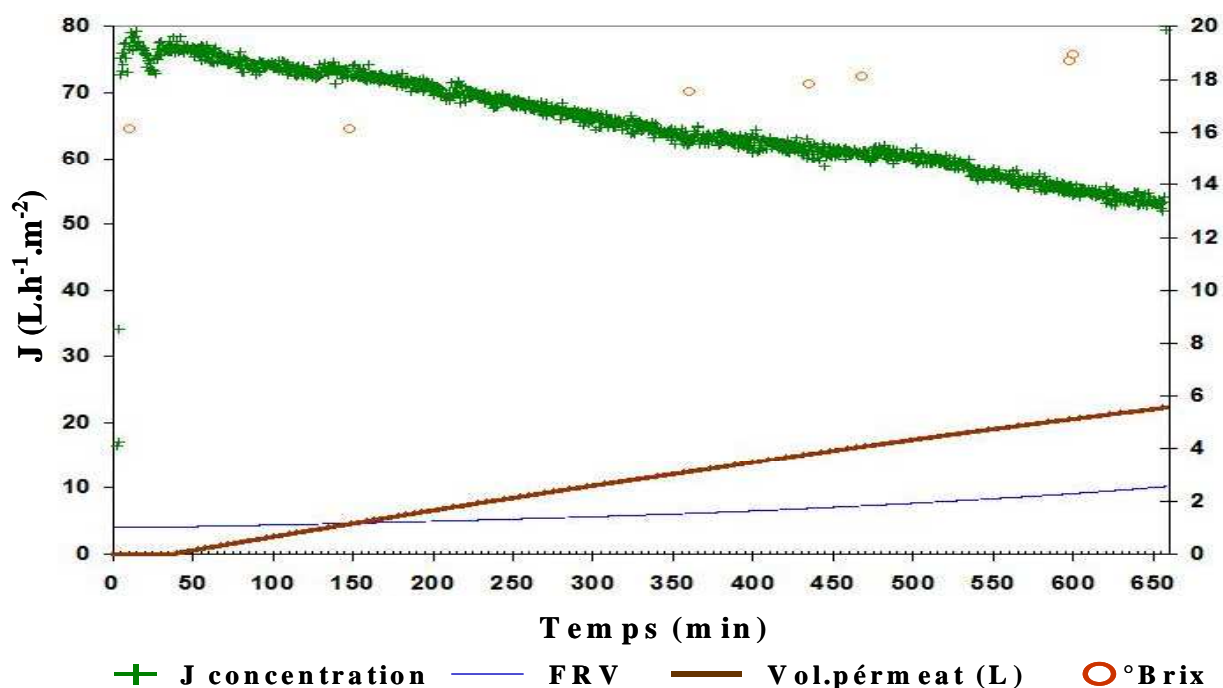


Figure 50 : Filtration d'une solution d'agavines à 20% sur une membrane Tami 15 kDa en vue de la production d'une solution clarifiée (conditions de filtration : 5 m/s, 2 bar, 60°C).

L'efficacité de cette étape de filtration est mise en évidence dans le Tableau 26 où sont reportées les caractéristiques de la solution initiale, du perméat et du rétentat.

Tableau 26 : Composition de la solution d'agavines à 20% (So), du perméat et du rétentat obtenus lors de la clarification de cette solution par filtration sur une membrane Tami 15 kDa.

Solution	Turbidité (NTU)	°Bx	Matière Sèche (g.L <sup>-1</sup> )	Saccharose (g.L <sup>-1</sup> )	Glucose (g.L <sup>-1</sup> )	Fructose (g.L <sup>-1</sup> )
Agavines 20%	12,2	18,6	187	9 ± 0,1	3 ± 0,1	5,2 ± 0,1
Perméat	0,6	17,6	180	9,5 ± 0,1	3,2 ± 0,1	5,4 ± 0,1
Rétentat	22,9	22,3	228	8,7 ± 0,1	2,9 ± 0,1	5,1 ± 0,1

D'après ces résultats, il n'y a que très peu de différences au niveau des teneurs en matière sèche de la solution initiale et du perméat, respectivement égales à 187 et 180 g.L<sup>-1</sup>. Cependant, on remarque que les composants responsables de la turbidité ont été pratiquement totalement retenus. La turbidité initialement égale à 12 ± 3 NTU chute à 0,6 NTU alors

qu'elle est égale à  $22,9 \pm 3$  NTU dans le rétentat. On constate également que les concentrations en glucose, fructose et saccharose sont pratiquement identiques dans les trois solutions. Le perméat obtenu au cours de cette étape constitue la solution d'agavines qui sera utilisée dans l'étape suivante comme solution d'alimentation.

## 2. Production de fructanes de haut DP

Cette étape a pour objectif la production de fructanes de haut poids moléculaire à partir de 200 mL de la solution d'agavines clarifiée. Toutefois, le perméat obtenu précédemment nous a semblé être trop concentré pour être utilisé directement sur une membrane de 10 kDa, c'est pourquoi nous avons donc décidé de le diluer jusqu'à la concentration de 2% avant de le filtrer sur la membrane Millipore 10 kDa-CR. Cette filtration a encore été réalisée dans une cellule agitée Amicon de diamètre 7,6 cm et la concentration a été poussée jusqu'à un FRV proche de 10, le rétentat représentant la fraction de fructanes de haut DP que l'on souhaitait récupérer.

Les flux de perméation obtenus sont présentés sur la Figure 51. On retrouve un profil de perméation similaire à celui obtenu lors des essais avec la solution d'agavines non clarifiée. On constate qu'en début d'expérience et jusqu'à un FRV de 2,5, la décroissance du flux est régulière et limitée (30% environ). Au-delà de ce FRV, la perte de perméabilité en fonction du temps augmente beaucoup plus vite. Cela s'explique parce que dans ce même temps, la concentration du rétentat augmente beaucoup. Si l'on s'intéresse aux valeurs du flux à l'eau avant et après filtration de la solution clarifiée, on constate que ces flux sont du même ordre de grandeur, ceci confirme l'absence d'interactions entre les constituants de la solution d'agavines et la membrane à base de CR. Le colmatage irréversible est donc négligeable.

La comparaison des profils de fructanes par Chromatographie Liquide d'Echange d'Anion Haute Performance (CLEAHP) du perméat et de la solution d'agavines présentés sur la Figure 52 confirme l'intérêt de cette étape de filtration. On constate en effet la quasi absence d'agavines de DP supérieur à 40 dans le perméat confirmant ainsi indirectement que ces dernières se sont concentrées dans le rétentat.

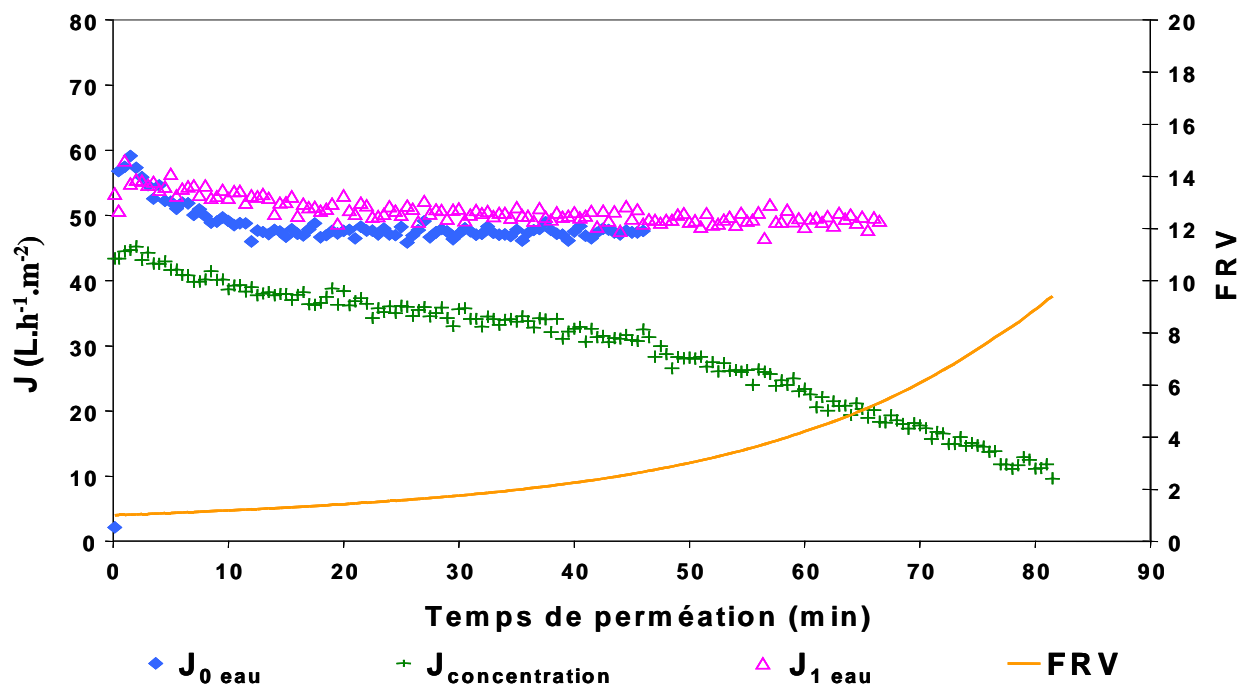


Figure 51 : Evolution en fonction temps du FRV et du flux de perméation d'une solution d'agavines clarifiée diluée à 2%, lors de sa filtration en cellule agitée sur une membrane Millipore 10 kDa-CR (350 rpm, 20°C, 2 bar), ainsi que celles des flux à l'eau mesurés avant et après filtration de la solution d'agavines.

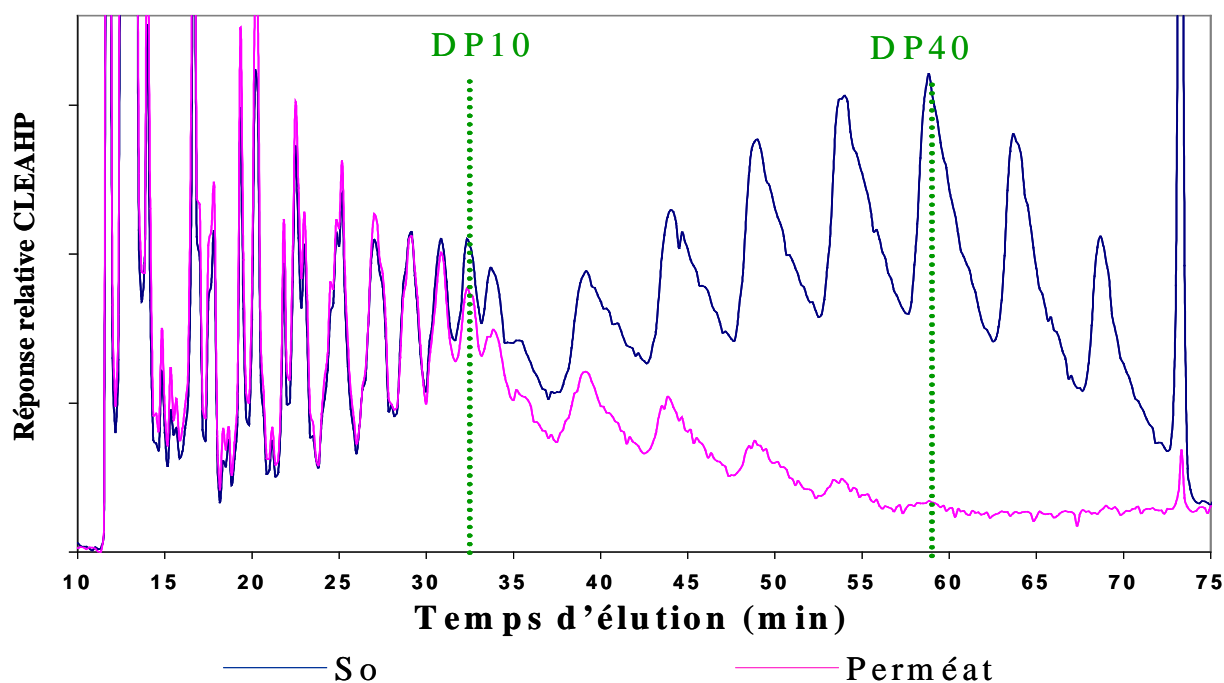


Figure 52: Profils CLEAHP d'une solution d'agavines clarifiée et diluée à 2% et du perméat obtenu lors de sa filtration en cellule agitée sur une membrane Millipore 10 kDa-CR (350 rpm, 20°C, 2 bar).

### 3. Production de fructanes de DP intermédiaire

50 mL de perméat obtenus au cours de l'étape précédente encore appelé perméat 10 kDa, ont ensuite été utilisés comme solution d'alimentation lors d'une étape de filtration sur membrane Millipore 1 kDa-CR. Cette filtration a été réalisée en cellule agitée avec une membrane de 3,7 cm de diamètre et a eu pour objectif l'obtention d'une solution riche en fructanes de faible DP. Les flux de perméation obtenus sont présentés sur la Figure 53.

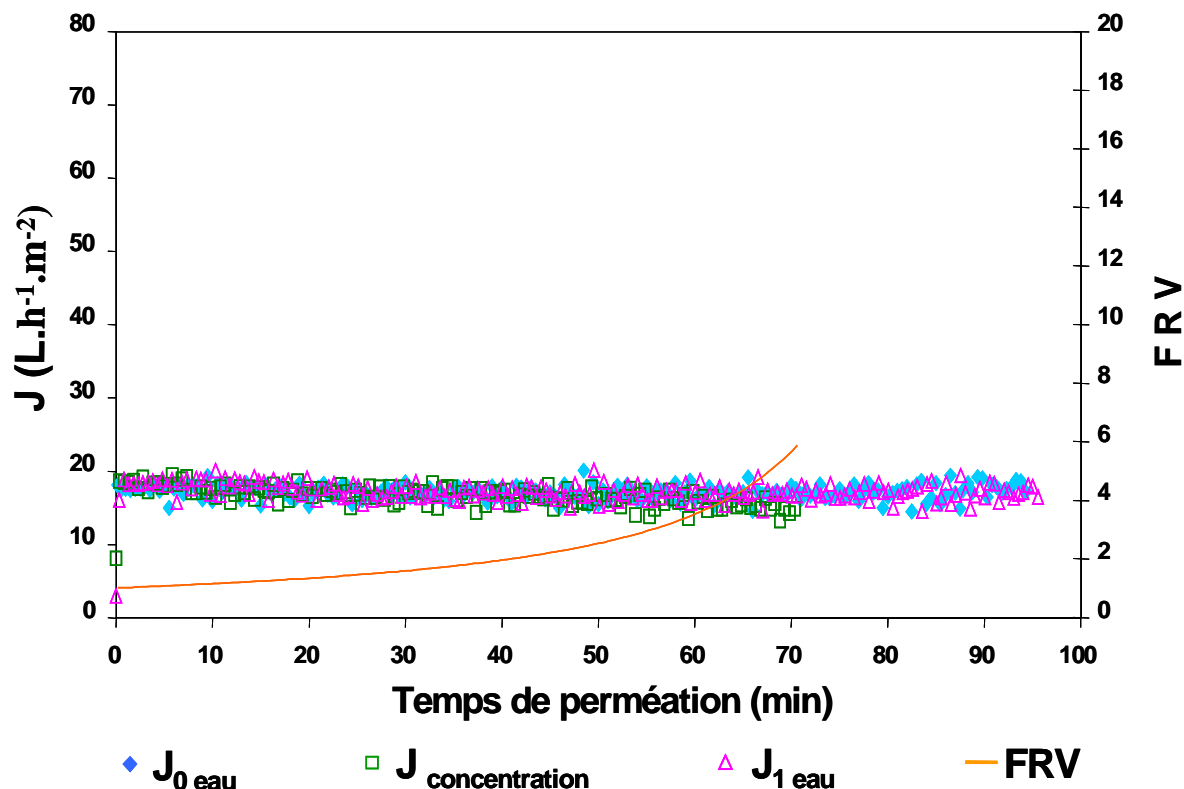


Figure 53 : Evolution en fonction temps du FRV et du flux de perméation du perméat 10 kDa lors de sa filtration en cellule agitée sur une membrane Millipore 1 kDa-CR (350 rpm, 20°C, 4 bar), ainsi que celles des flux à l'eau mesurés avant et après filtration de la solution d'agavines.

On constate d'après cette figure que le flux de perméation de la solution de fructanes est identique à ceux mesurés avec de l'eau pure avant et après filtration de la solution et ceci tout au long de l'expérience alors que le FRV passe de 1 à 6. Ceci confirme que le perméat 10 kDa ne contient plus de molécules colmatantes et que du fait de la nature de la membrane utilisée, il n'y a pas mise en place d'interactions irréversibles entre les molécules de la solution et la membrane.

Les profils CLEAHP du rétentat et du perméat obtenus sont comparés dans la Figure 54. On constate que la filtration sur membrane Millipore 1 kDa-CR du perméat 10 kDa permet d'obtenir 2 fractions de composition différente. La première (le perméat) ne renferme que des FOS, alors que la seconde (le rétentat) contient outre les FOS, des fructanes de DP compris entre 10 et 40. Il est probable qu'une diafiltration du rétentat sur cette même membrane aurait permis de réduire la proportion de FOS présents dans le rétentat.

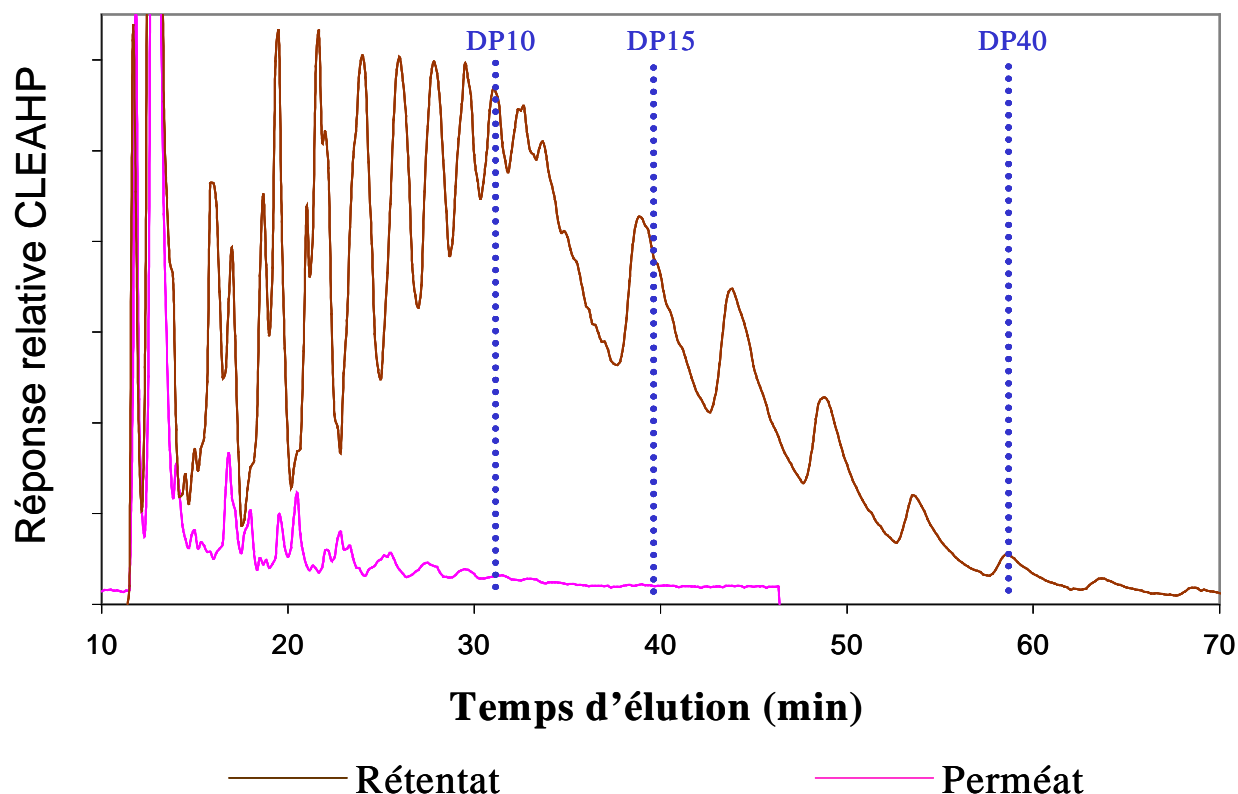


Figure 54 : Profils CLEAHP du rétentat et du perméat obtenus lors de la filtration du perméat 10 kDa en cellule agitée sur une membrane Millipore 1 kDa-CR (350 rpm, 20°C, 4 bar).

#### 4. Conclusion

La mise en œuvre successive des 3 premières étapes du procédé pressenti pour le fractionnement et la purification des fructanes et de FOS d'agave, nous a permis de confirmer l'intérêt de ce procédé.

Ainsi nous avons pu obtenir à partir d'une solution modèle d'agavine :

- une fraction enrichie en fructanes de haut DP (DP >40) correspondant au rétentat de la membrane Millipore 10 kDa-CR.

- une fraction enrichie en fructanes de DP intermédiaire ( $10 < DP < 40$ ) correspondant au rétentat de la membrane Millipore 1 kDa-CR.
- une fraction enrichie en FOS correspondant au perméat de la membrane Millipore 1 kDa-CR et qui pourra être purifiée ultérieurement (élimination des mono et disaccharides) par filtration sur une membrane Osmonic GE Sepa™ GH.

Toutefois, ces essais ayant été réalisés avec une solution modèle d'agavines, il nous faut vérifier que ces résultats se confirment sur solution réelle.

## D. VALIDATION SUR SOLUTION REELLE

Pour valider notre procédé, nous avons utilisé le jus brut d'*Agave tequilana* gracieusement fourni par la société Agaviotica et à partir duquel cette entreprise prépare la poudre FRUCTAGAVE PR-95 utilisée précédemment pour la préparation de la solution modèle. Avant de procéder aux essais de filtration, il nous a paru opportun de caractériser partiellement ce jus d'agave.

### 1. Caractéristiques de la solution réelle (Jus Brut d'*Agave tequilana*)

20 L de jus brut produit par la société Agaviotica ont été additionnés d'azide de sodium (0,02%) puis congelés avant d'être expédiés par avion. A sa réception, le jus a été entièrement décongelé, puis aliquoté par fractions de 1 L avant d'être recongelé jusqu'à son utilisation.

Le jus brut a une turbidité de  $216 \pm 4$  NTU liée à la présence de matière en suspension et de résidus solides sédimenteux (petites pierres et fibres d'agave principalement). Afin d'éviter la détérioration des membranes et d'éliminer les plus grosses impuretés, ce jus d'agave brut a été filtré sur fritté SCHOTT Duran No 2 dont la taille des pores est comprise entre 40-100  $\mu\text{m}$ . C'est donc ce jus filtré qui sera utilisé comme solution d'alimentation pour la première étape de notre procédé. Les caractéristiques physico-chimiques de ce jus sont présentées dans le Tableau 27.



Tableau 27 : Caractéristiques physico-chimiques de jus brut préfiltré sur fritté N°2 (40-100 µm).

Caractéristiques physico-chimiques	Jus brut préfiltré
pH	5,1
°Brix	14 ,0
Turbidité (NTU)	200 ,0 ± 5,0
Matière sèche (g.L <sup>-1</sup> )	139 ,0 ± 1,0
Protéine (g.L <sup>-1</sup> )	3 ,0 ± 0,5
Cendres (g.L <sup>-1</sup> )	3 ,0 ± 0,1
Sucres totaux (g.L <sup>-1</sup> )	121 ,0 ±10,0
Viscosité (mPa.s)	10 ,0 ± 0,2

On constate que la préfiltration a permis, outre l'élimination des particules, de réduire la turbidité. Le jus brut filtré renferme 140 g.L<sup>-1</sup> de matière sèche composée majoritairement de sucres (les sucres totaux représentant 87% de l'extrait sec). Par ailleurs, on a vérifié que le profil de polydispersité des fructanes du jus brut (non montré ici) est très similaire à ceux des fructanes de l'extrait de cœur d'*agave tequilana* (cf section II) et de la solution d'agavines préparée à partir de la poudre d'agavines PR-95.

## 2. Clarification du jus brut préfiltré

### a. Filtration sur la membrane Tami 15 kD

Afin d'évaluer l'incidence des paramètres opératoires, nous avons réalisé une étude similaire à celle conduite avec la solution modèle d'agavines (cf paragraphe III.C.1). Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau 28.

Tableau 28 : Impacts des conditions opératoires sur le flux, la rétention et la sélectivité lors de la filtration du jus brut préfiltré sur une membrane Tami 15 kDa.

Variable	Valeurs testées	Flux	Rétention
Vitesse (m.s <sup>-1</sup> )	3, 5	~	↗
Pression (bar)	1, 2, 4, 6	↗	↗
Température (°C)	20, 40, 60	↗	↘

Concernant l'impact des différents paramètres sur les valeurs du flux, on observe des tendances similaires à celles observées lors de la filtration de la solution modèle (Cf Tableau 25). Une augmentation limitée de la pression ou de la température améliore le flux de perméation.

Cependant, contrairement à ce qui avait été observé lors de la filtration de la solution d'agavines, l'augmentation de la pression entraîne une augmentation de la rétention des fructanes. Par exemple, à FRV 1, la rétention des fructanes de DP 40 est respectivement égale à 15, 28, 37 et 45% lorsque la pression transmembranaire est égale à 1, 2, 4 et 6 bar. Dans le cas de la solution modèle, nous avons obtenu les rétentions suivantes 30, 25 et 15% pour les pressions transmembranaires égales respectivement à 2, 4 et 6 bar. Enfin l'impact des différents paramètres sur la sélectivité est également différent de celui observé avec la solution modèle. Globalement, l'augmentation des paramètres qui tendent à améliorer le flux réduit la sélectivité.

Par ailleurs, comme on peut le voir dans le Tableau 29, les flux obtenus dans des conditions opératoires similaires sont moins élevés avec la solution réelle qu'avec la solution modèle et l'impact de l'augmentation de la concentration est plus marqué.

**Tableau 29 : Comparaison des flux obtenus pendant la concentration d'une solution d'agavines à 20% et du jus brut préfiltré à 14°Bx sur une membrane Tami 15 kDa (2 bar, 3m.s<sup>-1</sup>, 60°C).**

<b>Solution d'alimentation</b>	<b>Flux (L.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup>)</b>		
	<b>FRV 1</b>	<b>FRV 1,5</b>	<b>FRV 2</b>
<b>Sol. Agavine à 20 %</b>	80	64	35
<b>Jus brut A. tequilana 14 °Bx</b>	60	40	30

Cette diminution du flux est sans doute liée à la complexité de la solution brute et au dépôt d'une plus grande quantité de solides à la surface de la membrane. Ce colmatage de surface conduit également à une augmentation de la rétention qui est comprise entre 50 et 90% pour les fructanes de DP<sub>≥</sub> 40 (cf Figure 55) dans le cas du jus brut filtré, alors que dans le cas de la solution d'agavines à 20%, ces rétentions sont comprises entre 15 et 65%.

En raison des pertes de sélectivité et surtout de l'augmentation de la rétention des fructanes observée, la clarification du jus brut filtré sur une membrane Tami 15 kDa ne semble pas judicieuse. Nous avons donc décidé de tester une membrane de nature et configuration similaire mais présentant un plus grand diamètre de pores, à savoir une membrane Tami 50 kDa.

b. Comparaison des performances des membranes Tami 15 et 50 kDa

Dans un premier temps, le jus brut préfiltré a été filtré dans les mêmes conditions sur les membranes Tami 15 kDa et Tami 50 kDa à savoir à 60°C, 3 m.s<sup>-1</sup> et 2 bar. Les valeurs des flux obtenus au cours de la concentration sont présentées dans le Tableau 30.

**Tableau 30 : Comparaison des flux obtenus pendant la concentration du jus brut préfiltré sur des membranes Tami 15 kDa et 50 kDa (2 bar, 3m.s<sup>-1</sup>, 60°C).**

Membrane	Flux de perméation du jus brut préfiltré (L.h <sup>-1</sup> .m <sup>-2</sup> )		
	FRV 1	FRV 1,5	FRV 2
<b>Tami 15 kDa</b>	60	40	30
<b>Tami 50 kDa</b>	100	70	50

Tout d'abord, on constate que quelle que soit la membrane testée, on observe une réduction du flux de perméation égale à 50 % lorsque le FRV passe de 1 à 2. Toutefois, comme le flux initial sur la membrane Tami 50 kDa est 2 fois plus élevé que sur la membrane Tami 15, les performances en terme de flux de cette membrane sont plus intéressantes.

Il en est de même pour les performances en terme de rétention. En effet, d'après les profils de rétention obtenus à FRV 1 et présentés sur la Figure 55, on constate que les taux de rétention des fructanes sont globalement plus de 2 fois plus faibles sur la membrane Tami 50 kDa par rapport à la membrane Tami 15 kDa .

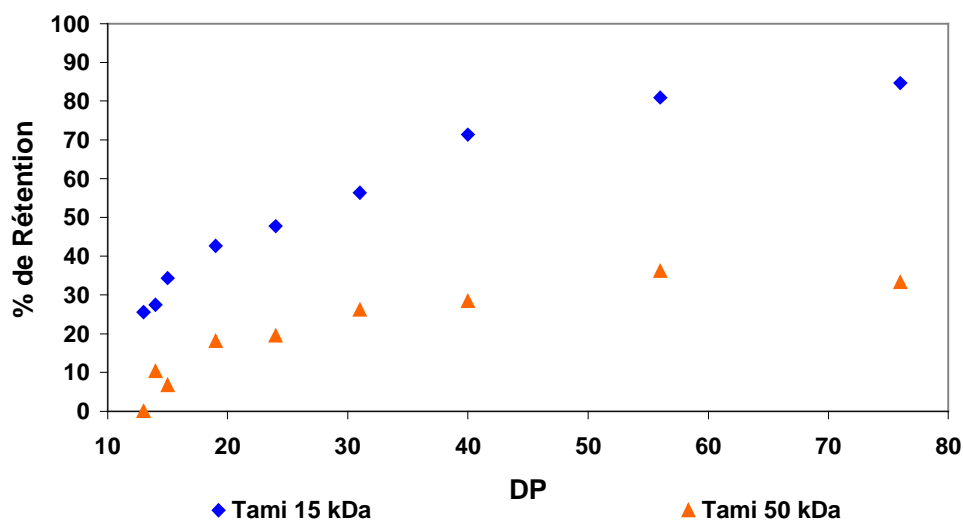


Figure 55 : Comparaison des profils de rétention des fructanes en fonction de leur DP obtenus lors de la filtration du jus brut préfiltré sur les membranes Tami 15 kDa et 50 kDa (conditions de filtration : 2 bar,  $3\text{m.s}^{-1}$ ,  $60^{\circ}\text{C}$ )

Enfin, si on s'intéresse à l'efficacité de la clarification, on constate d'après les valeurs rapportées dans le Tableau 31, que les performances des 2 membranes sont similaires. La turbidité est respectivement égale à  $12 \pm 3$  et  $15 \pm 3$  NTU pour les perméats obtenus sur les membranes 15 et 50 kDa. La clarification du jus préfiltré en terme d'abaissement de la turbidité est donc supérieure à 90%.

Tableau 31 : Caractéristiques physico-chimiques des perméats obtenus lors de la filtration du jus brut préfiltré sur les membranes Tami 15 et 50 kDa.

Analyses	Perméat Tami 15 kDa	Perméat Tami 50 kDa
NTU	$12 \pm 3$	$15 \pm 3$
°Brix	9,6	11,4
MS ( $\text{g.L}^{-1}$ )	$93 \pm 2$	$114 \pm 2$

Il apparaît également, lorsque l'on compare la composition des perméats à celle du jus brut préfiltré (cf Tableau 27), que la filtration sur la membrane Tami 15 kDa conduit à une rétention de matière sèche près de 2 fois supérieure (33 %) à celle observée lors de la filtration sur la membrane Tami 50kDa (18 %).

Par conséquent, pour une efficacité similaire en terme de clarification, la membrane Tami 15 kDa est plus rétentive et conduit à un rendement de récupération des fructanes plus

faible que la membrane Tami 50kDa. C'est pourquoi nous avons choisi la membrane Tami 50 kDa pour l'étape de clarification du jus brut.

c. Etude de l'incidence des conditions opératoires sur la perméabilité de la Membrane Tami 50 kDa

Afin de se placer dans les conditions les plus favorables lors de la production du jus clarifié, nous avons testé l'incidence des paramètres opératoires sur la valeur du flux de perméation. Les tendances observées sont résumées dans le Tableau 32.

**Tableau 32 : Impacts des conditions opératoires sur le flux lors de la filtration du jus brut préfiltré sur une membrane Tami 50 kDa.**

Variable	Valeurs testées	Flux
<b>Vitesse (<math>\text{m.s}^{-1}</math>)</b>	2, 3, 5	↗
<b>Pression (bar)</b>	1, 2, 4	↗
<b>Température (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</b>	20, 40, 60	↗

Contrairement à ce qui a été observé dans le cas des filtrations sur la membrane Tami 15 kDa, on constate que l'augmentation de la vitesse de circulation entraîne une augmentation du flux. Mais en raison de la production de mousse dans le rétentat, due vraisemblablement à la présence de protéines, et d'un brunissement plus important de la solution, il n'est pas possible de travailler à une vitesse supérieure à  $3 \text{ m.s}^{-1}$ .

Concernant l'impact de la pression transmembranaire, nous n'avons pas observé d'amélioration de la perméabilité entre 1 et 2 bar. Par contre le flux mesuré à 4 bar est supérieur à celui obtenu à 2 bar.

Enfin, comme lors des filtrations de la solution modèle et du jus brut préfiltré sur la membrane 15 kDa, l'augmentation de la température permet, là encore, d'augmenter les flux de perméation.

Sur la base de ces observations, les conditions retenues pour la clarification par filtration sur la membrane Tami 50 kDa du jus brut préfiltré sont les suivantes :

Température :  $60^{\circ}\text{C}$

Pression transmembranaire : 1 bar

Vitesse de circulation :  $3 \text{ m.s}^{-1}$ .

#### d. Production de jus clarifié

La clarification a été réalisée en batch et répétée deux fois selon le protocole suivant : 4,6 L de jus brut préfiltré ont été placés dans le bac d'alimentation et afin que les couches limites et dépôt de surface se stabilisent, perméat et rétentat ont été recyclés pendant les 30 premières minutes de filtration. Ce laps de temps écoulé, le perméat a été collecté séparément entraînant dans le même temps la concentration du rétentat, le FRV final atteint étant égal à 2,6. Les évolutions du flux de perméation, du FRV et de l'extrait sec soluble ( $^{\circ}\text{Brix}$ ) du perméat et du rétentat au cours de la production de jus clarifié sont présentées sur la Figure 56. On constate que le flux de perméation chute de façon continue avec l'augmentation du FRV. A FRV 2, le flux atteint ( $40 \text{ L.h}^{-1}\text{m}^{-2}$ ) est 2 fois plus faible que celui mesuré à FRV 1 ( $80 \text{ L.h}^{-1}\text{m}^{-2}$ ).

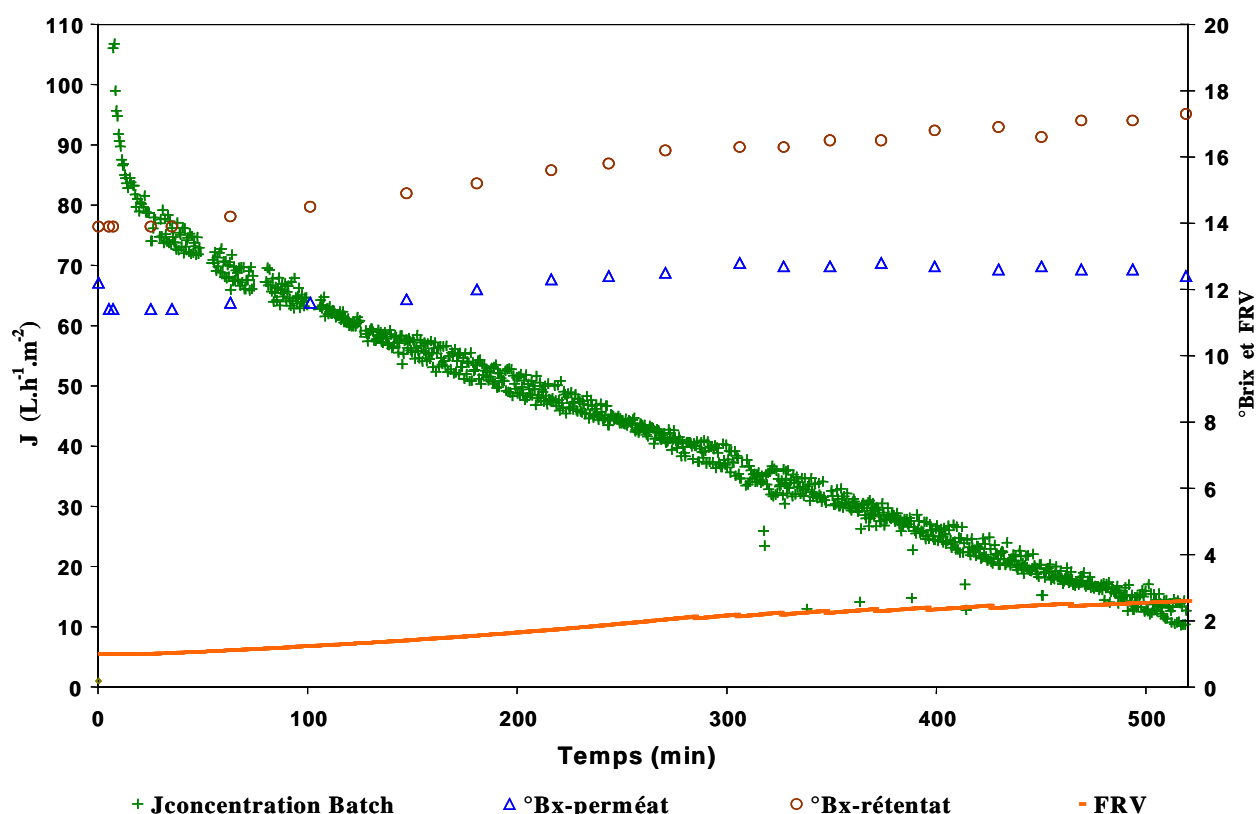


Figure 56 : Evolutions du flux de perméation, du FRV et de la composition ( $^{\circ}\text{Brix}$ ) du perméat et du rétentat lors de la production de jus clarifié à partir du jus brut préfiltré (filtration tangentielle sur membrane Tami 50 kDa à 1 bar,  $60^{\circ}\text{C}$ ,  $3 \text{ m.s}^{-1}$ ).

Au final, 5,7 L de jus clarifié ont ainsi été produits. Ce jus présente une concentration en matière sèche égale à  $125 \text{ g.L}^{-1}$  et une turbidité de  $12 \pm 3 \text{ NTU}$ . La clarification a donc permis d'abaisser de 10% la teneur en matière sèche et de 95% la turbidité du jus. Comme on peut l'observer sur la Figure 57, le jus clarifié (perméat) est transparent et orangé, alors que le jus brut et le rétentat sont très troubles et de couleur brune.



**Figure 57: Photos du jus brut préfiltré ( $S_0$ ), du perméat et du rétentat obtenus lors de l'étape de clarification sur la membrane Tami 50 kDa.**

D'après la Figure 56, la rétention de l'extrait sec soluble global exprimé en °Brix semble rester constante au cours de la concentration. En effet, ce paramètre évolue de façon similaire dans le rétentat et le perméat (courbes parallèles). Cependant, si l'on s'intéresse à la rétention des fructanes en fonction de leur DP, on constate que cette dernière augmente avec la concentration de la solution et ce d'autant plus que les DP sont élevés. D'après la Figure 58, on remarque que, tant que le FRV est inférieur à 2, il n'y a pas d'incidence de la concentration sur le taux de rétention des fructanes de DP inférieur à 60. Par contre, lorsque le DP est supérieur à 2, on observe une augmentation du taux de rétention des fructanes de DP supérieur à 30.

Par conséquent, lors de la mise en œuvre de ce procédé à l'échelle industrielle, il pourra s'avérer judicieux de travailler à FRV de l'ordre de 1,5 en mode diafiltration. On aura ainsi des flux de perméation supérieurs à  $50 \text{ L.h}^{-1}\text{m}^{-2}$  et l'on pourra récupérer un maximum de fructanes dans le perméat ce qui augmentera le rendement du procédé.

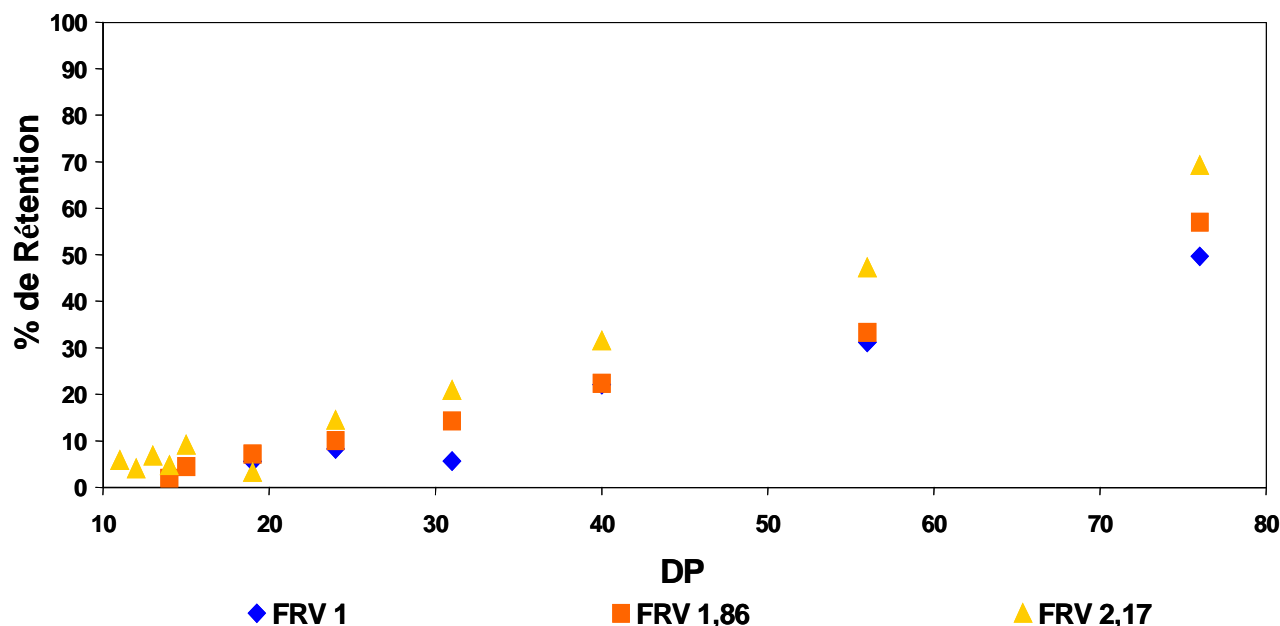


Figure 58 : Evolution des profils de rétention des fructanes en fonction de leur DP au cours de la concentration du jus brut préfiltré sur une membrane Tami 50 kDa. (Conditions de filtration : 1 bar, 3 m.s<sup>-1</sup>, 60°C).

### 3. Production d'une fraction riche en fructanes de haut DP

Cet objectif est atteint en filtrant le jus clarifié produit au cours de l'étape précédente sur une membrane Millipore 10kDa-CR. Contrairement à tous les essais précédemment réalisés sur ce type de membrane, la filtration est cette fois mise en œuvre dans des conditions de filtration tangentielle en recyclant complètement le rétentat. Les évolutions du flux de perméation, du FRV et de l'extrait sec soluble (°Brix) du perméat et du rétentat au cours de la filtration du jus clarifié ainsi que les flux à l'eau avant et après filtration du jus clarifié sont présentées sur la Figure 59.

Comme au cours de l'étape précédente, on constate que le flux de perméation diminue au cours de la concentration. Ce flux, de l'ordre 28 L.h<sup>-1</sup>m<sup>-2</sup> à FRV 1, chute jusqu'à 7,2 L.h<sup>-1</sup>m<sup>-2</sup> à FRV 6. Toutefois, dans le cas présent, à faible FRV, la chute de flux est moins importante que dans le cas de la membrane Tami 50 kDa. A FRV 2, on observe respectivement une chute de perméabilité de l'ordre de 30 et 50% respectivement pour les membranes Millipore 10 kDa-CR et Tami 50 kDa. De plus, on constate que le flux à l'eau après filtration de la solution, retrouve sa valeur initiale après 45 min de filtration. On confirme ainsi que sur ce type de membrane, le colmatage irréversible est nul. La réduction du flux est liée aux phénomènes de polarisation qui s'accroissent avec la concentration, à



l'augmentation de la pression osmotique qui réduit la force motrice effective ainsi qu'à la mise en place d'un dépôt de surface non stabilisé qui s'élimine facilement par filtration d'eau.

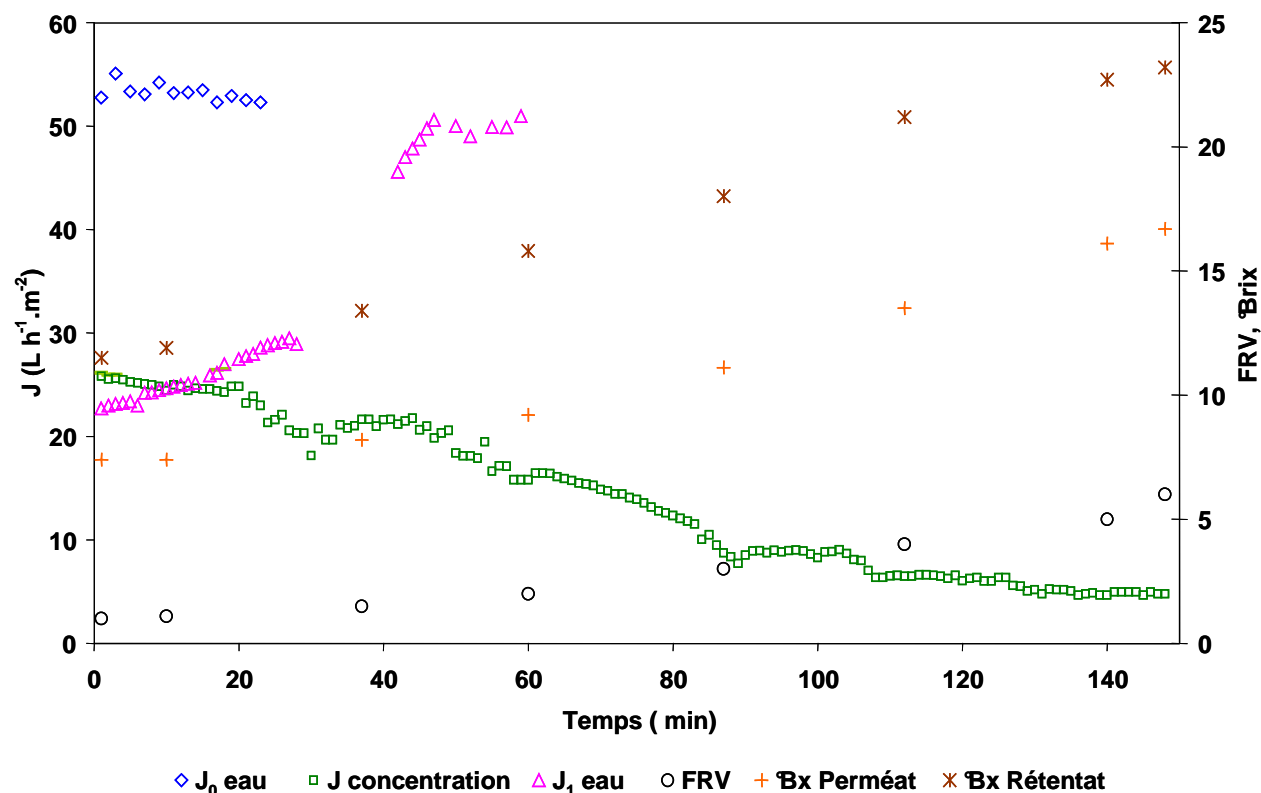


Figure 59 : Evolutions des flux de perméation, du FRV et de la composition (°Brix) du perméat et du rétentat lors de la filtration d'eau et de jus clarifié (filtration tangentielle sur membrane Millipore 10 kDa-CR à 2 bar, 40°C, débit de circulation 5 L. min<sup>-1</sup>).

L'évolution des profils de rétention des fructanes en fonction de leur DP au cours de la concentration de la solution est présentée sur la Figure 60.

On observe ici une tendance inverse à celle observée lors de la filtration sur la membrane Tami 50 kDa. La rétention des fructanes décroît lorsque la concentration augmente. Au-delà du FRV 2, la rétention des fructanes de DP inférieur à 25-30 est nulle.

Par conséquent, si l'on souhaite conserver dans le rétentat les fructanes de DP supérieur à 40, il est nécessaire de ne pas dépasser un FRV de 2 (la rétention de ce type de fructanes reste alors supérieure à 70%), puis de procéder à une diafiltration pour éliminer les structures de DP inférieur et purifier la fraction riche en fructanes de haut DP.

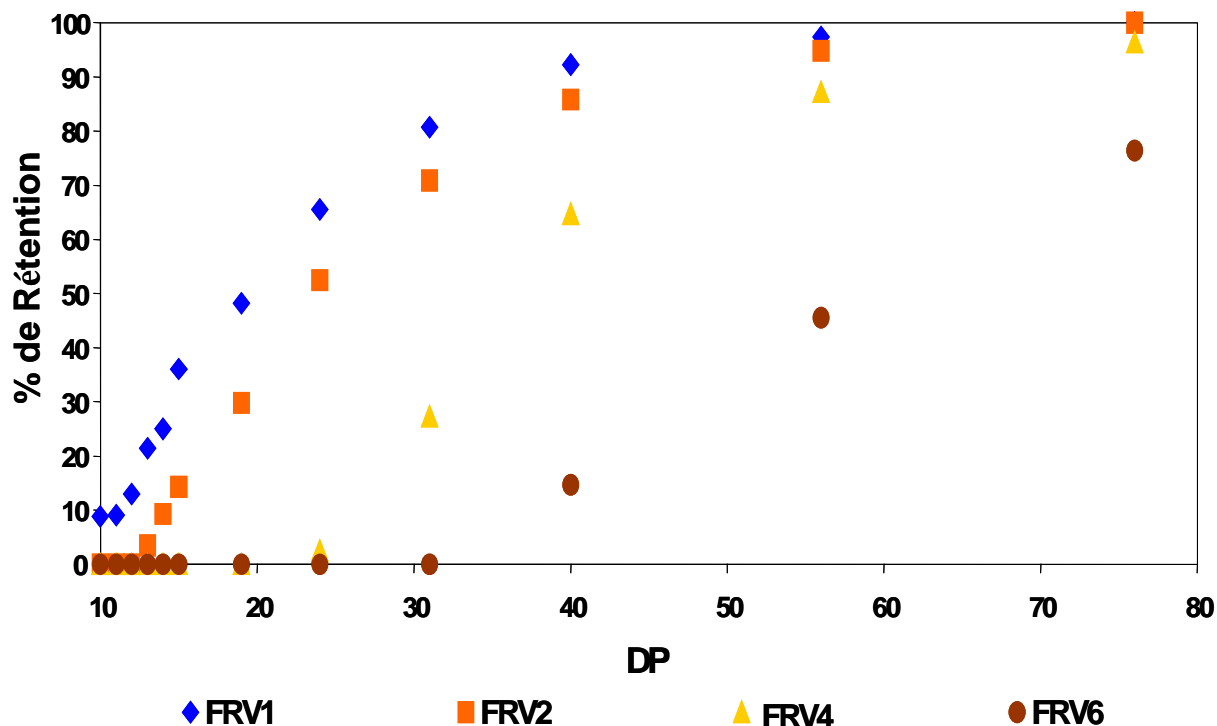


Figure 60 : Evolution des profils de rétention des fructanes en fonction de leur DP au cours de la concentration du jus clarifié sur une membrane Millipore 10 kDa-CR (conditions de filtration : 2 bar, 40°C, débit d'alimentation 5 L.min<sup>-1</sup>).

#### 4. Production d'une fraction riche en fructanes de DP intermédiaire

Comme cela a été observé lors des essais sur solution modèle, cet objectif est atteint en filtrant le perméat obtenu précédemment (perméat 10 kDa) sur une membrane Millipore 1 kDa-CR. Cette filtration est également mise en œuvre en mode tangentiel en recyclant complètement le rétentat. Les évolutions du flux de perméation, du FRV et de l'extrait sec soluble (°Brix) du perméat et du rétentat au cours de la filtration du perméat 10 kDa ainsi que les flux à l'eau avant et après filtration de la solution d'agavines sont présentés sur la Figure 61.

L'évolution du flux de perméation est similaire à celle observée sur la membrane Millipore 10 kDa. Le flux chute progressivement de 10 L.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup> à FRV 1 à 1 L.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup> à FRV 4. Mais la perte de perméabilité est plus marquée que dans le cas de la membrane Millipore 10 kDa-CR. A FRV 2, on observe respectivement une chute de perméabilité de l'ordre de 70 et 30% pour les membranes Millipore 1 kDa-CR et 10 kDa-CR. Comme lors de l'étape

précédente, on constate que le colmatage irréversible est quasi nul. Les flux à l'eau avant et après filtration de la solution sont pratiquement égaux.

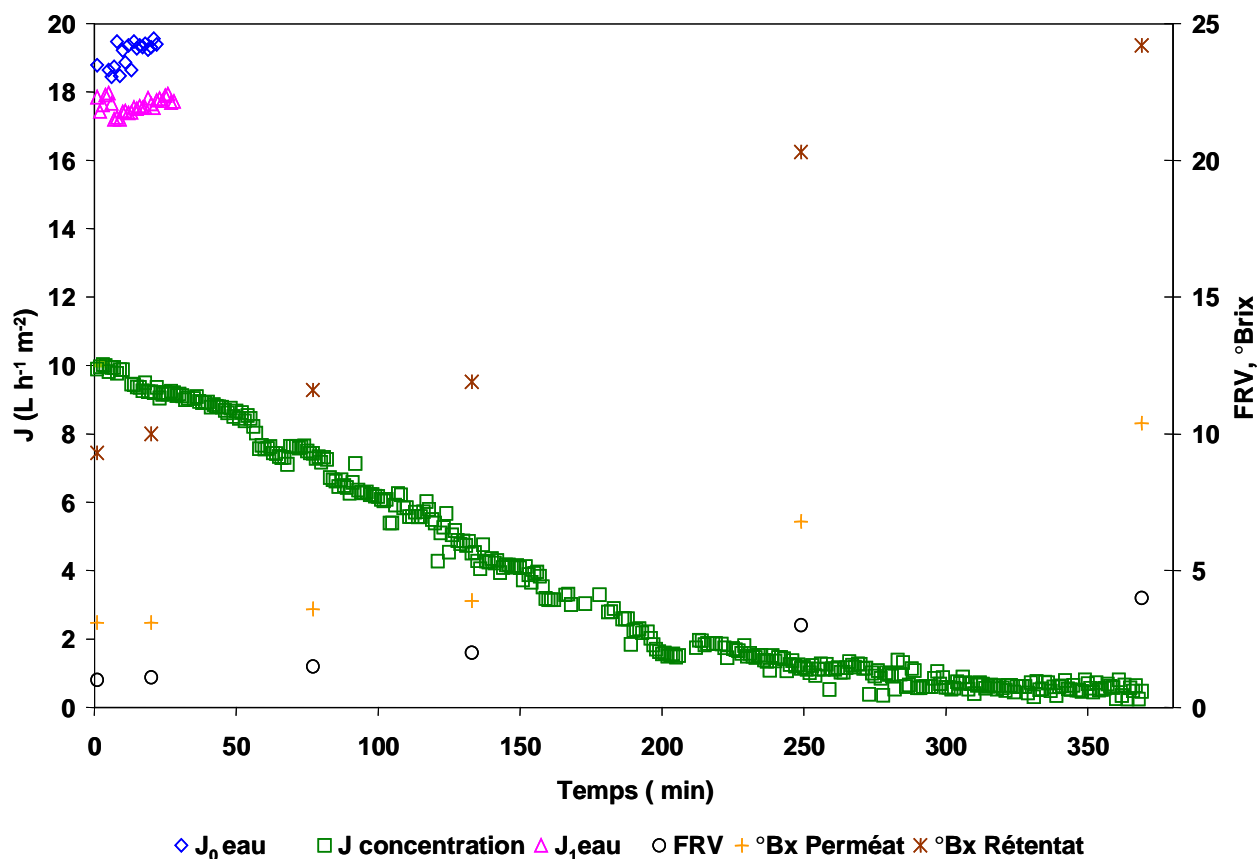


Figure 61 : Evolutions des flux de perméation, du FRV et de la composition (°Brix) du perméat et du rétentat lors de la filtration d'eau et de perméat 10 kDa (filtration tangentielle sur membrane Millipore 1 kDa-CR à 4 bar, 40°C, débit de circulation 5 L. min<sup>-1</sup>).

En ce qui concerne les profils de rétention des fructanes en fonction de leur DP présentés Figure 62, on constate également une évolution similaire à celle remarquée lors de la filtration sur membrane Millipore 10 kDa-CR. La rétention diminue lorsque la concentration augmente.

Il est important de noter qu'à FRV 2, la rétention du saccharose est de l'ordre de 30 % et celle des FOS de DP 9 est égale à 70 %. Par conséquent si l'on veut retenir au maximum les fructanes de DP compris entre 10 et 40, dans des conditions de débit acceptables, il faudra travailler à un FRV de l'ordre de 2 à 2,5 en mode diafiltration.

Le perméat obtenu à l'issue de cette étape sera utilisé comme solution d'alimentation pour l'étape suivante. Il renferme principalement des fructanes de DP inférieur à 10 c'est-à-dire des FOS, du saccharose, du glucose et du fructose.

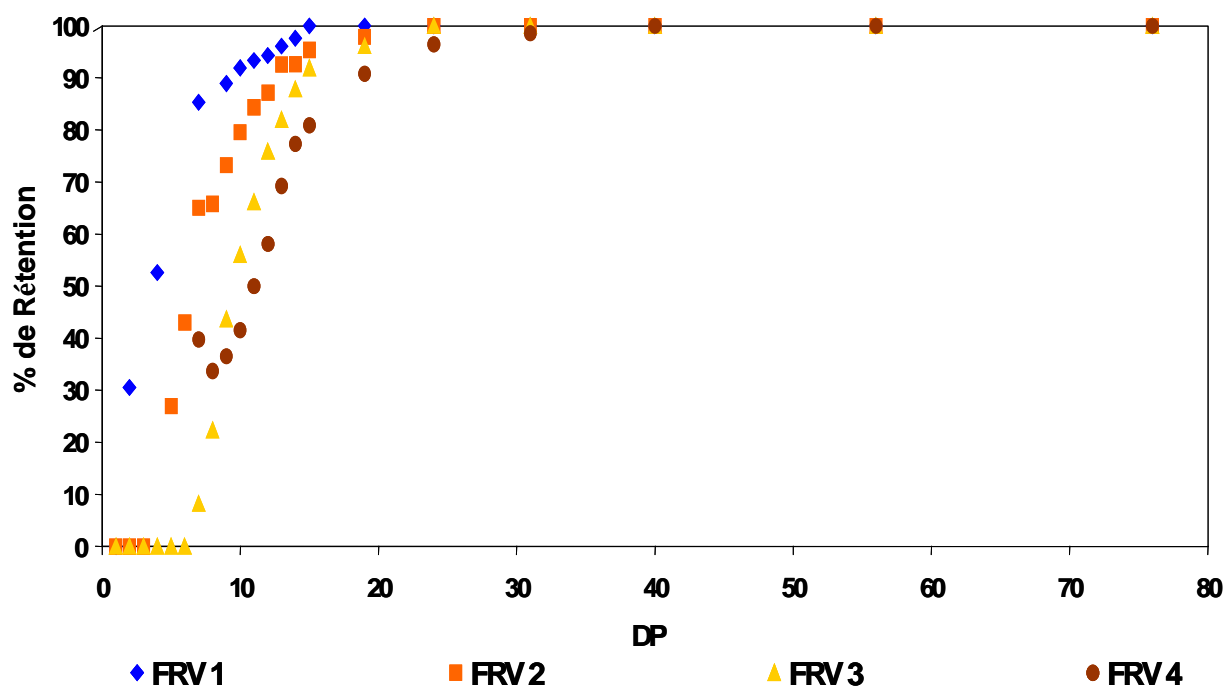


Figure 62 : Evolution des profils de rétention des fructanes en fonction de leur DP au cours de la concentration du perméat 10 kDa sur une membrane Millipore 1 kDa-CR (conditions de filtration : 4 bar, 40°C, débit d'alimentation 5 L.min<sup>-1</sup>)

## 5. Production d'une fraction riche en FOS exempte de sucres

Cette dernière étape est importante puisqu'il s'agit d'obtenir, à partir du perméat précédent, un concentrat de FOS exempt de mono et disaccharides. Lors de l'étude sur solution modèle, nous avons réalisé des essais de filtration en mode frontal sur une membrane Osmonic GE Sepa™ GH. Pour valider cette étape sur solution réelle, nous allons utiliser cette même membrane dans un module de filtration tangentielle. Les conditions opératoires ont été fixées en se basant sur les recommandations du fournisseur. Ainsi, nous avons travaillé avec une pression transmembranaire de 10 bar, à une température de 60°C et un débit de circulation de 5 L.min<sup>-1</sup>.

Les évolutions du flux de perméation, du FRV et de l'extrait sec soluble (°Brix) du perméat et du rétentat au cours de la filtration du perméat 1 kDa ainsi que les flux à l'eau avant et après filtration de la solution de fructanes sont présentés sur la Figure 63.

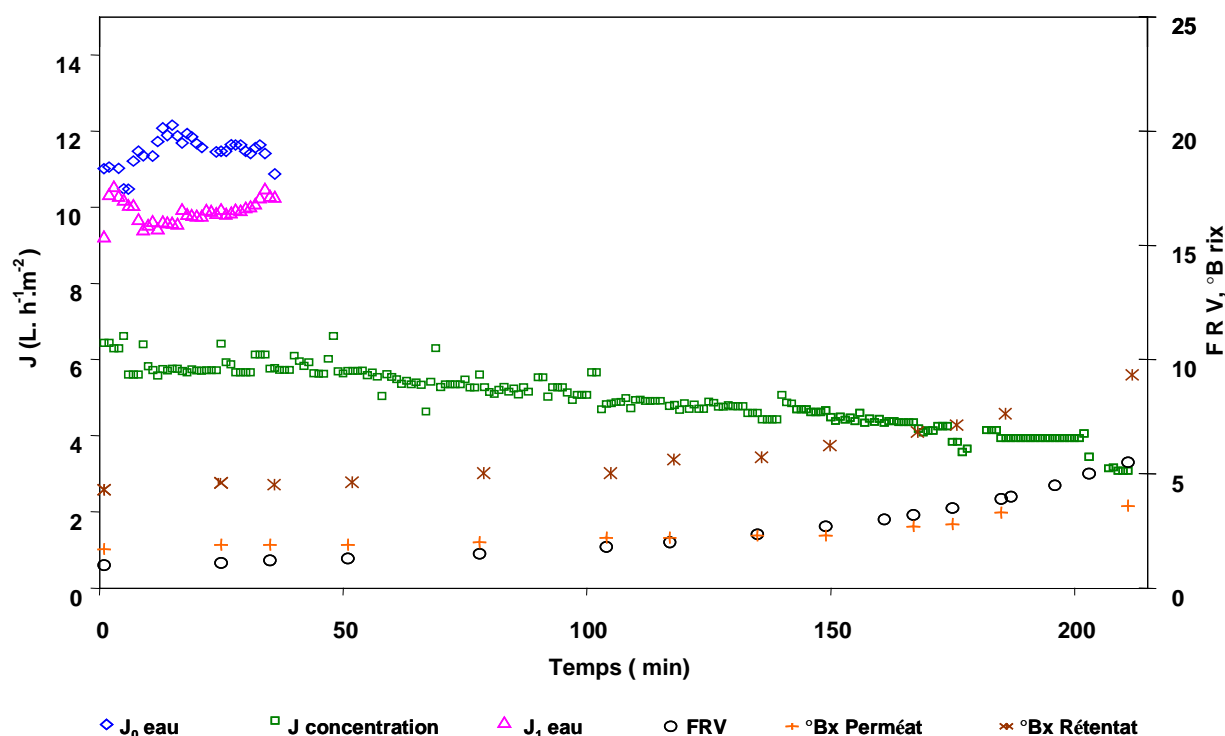


Figure 63 : Evolutions des flux de perméation, du FRV et de la composition (°Brix) du perméat et du rétentat lors de la filtration d'eau et de perméat 1 kDa (filtration tangentielle sur membrane Osmonic GE Sepa™ GH à 10 bar, 40°C, débit de circulation 5 L. min<sup>-1</sup>).

On remarque que, bien que la concentration ait été poussée jusqu'à un FRV de 5,5, le flux de perméation a peu chuté. Il varie de  $6 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$  à FRV 1 à un peu moins de  $4 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$  à FRV 5,5. Comme les membranes à base de CR, cette membrane ne présente pas de fortes interactions avec les constituants du mélange filtré. Les flux à l'eau avant et après filtration sont similaires et égaux à  $10 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ .

En raison de la grande variété des structures des FOS présents dans la solution et de la saturation du détecteur ampérométrique de la Dionex, l'analyse des profils chromatographiques n'a pas été simple. Il en résulte une plus grande imprécision sur le calcul des taux de rétention et par voie de conséquence, les évolutions de ce paramètre en fonction de la concentration pas ne sont faciles à analyser comme on peut le constater sur la Figure 64.

Toutefois, d'après cette figure, on observe une tendance à l'augmentation des taux de rétention avec l'augmentation du FRV. A FRV 5,5, le taux de rétention du saccharose est pratiquement de 100%. Par conséquent et sur la base de ces résultats, si l'on souhaite éliminer ce sucre du rétentat, il est préférable de maintenir le FRV entre 1 et 2,5 et de procéder à une diafiltration pour éliminer le saccharose.

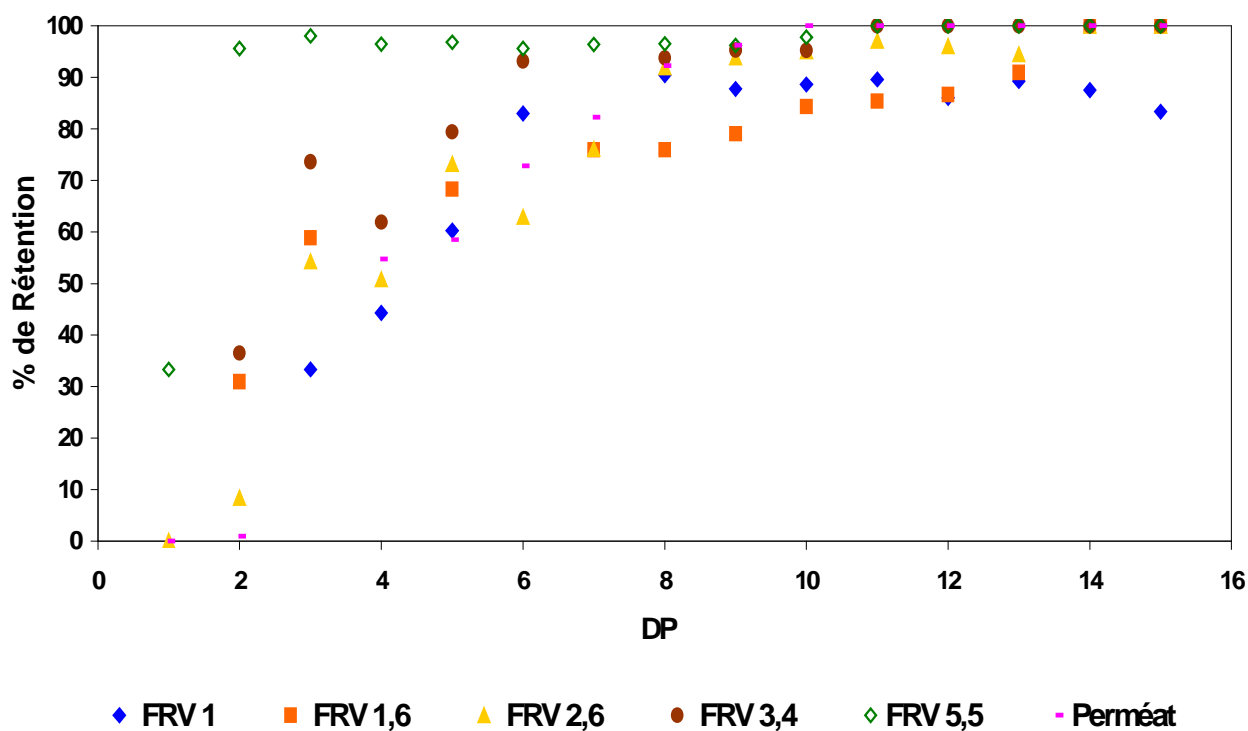


Figure 64 : Evolution des profils de rétention des fructanes en fonction de leur DP au cours de la concentration du perméat 1 kDa sur une membrane Osmonic GE Sepa™ GH (conditions de filtration : 10 bar, 40°C, débit d'alimentation 5 L.min<sup>-1</sup>).

## 6. Conclusion

Les résultats obtenus au cours des essais réalisés sur solution réelle confirment les conclusions obtenues sur solution modèle. Il est en effet possible, suite à la mise en œuvre successive de 4 étapes de filtration sur membrane, de clarifier et de fractionner un jus brut d'*Agave tequilana* afin d'obtenir 3 fractions renfermant respectivement des fructanes de DP élevés (>40), des fructanes de DP intermédiaires (10<DP< 40) et des FOS exempts de mono et disaccharides (DP<10). Toutefois en raison de la présence dans la solution brute de

molécules colmatantes inexistantes dans la solution modèle, l'étape de clarification initialement prévue sur une membrane Tami 15 kDa a du être réalisée sur une membrane Tami 50 kDa.

Le schéma du procédé mis en œuvre incluant un bilan matière des différentes étapes est présenté sur la Figure 65.

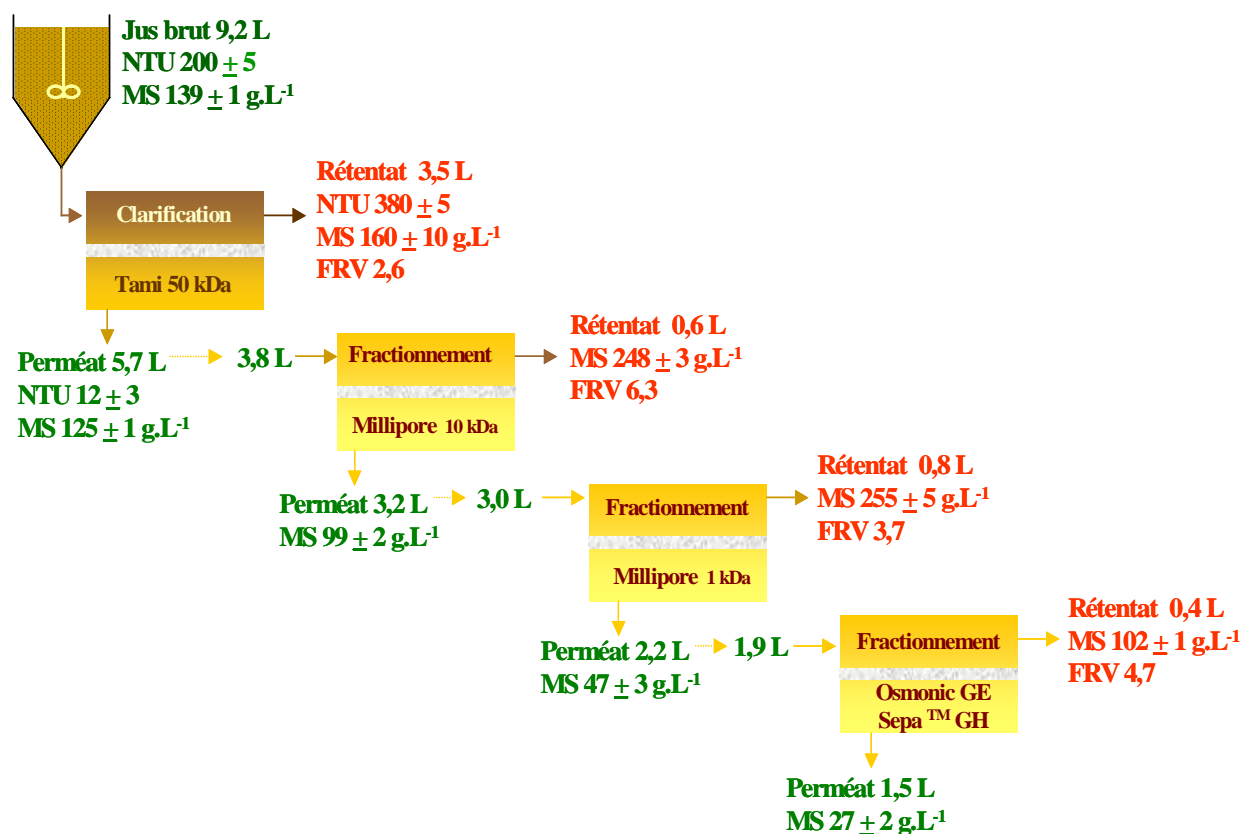


Figure 65 : Clarification et fractionnement du jus brut d'*Agave tequilana* par une succession de filtrations sur membranes. MS= concentration en matière sèche ; FRV= facteur de réduction volumique.

A l'issue de ces 4 étapes de filtration, la matière sèche contenue dans le jus brut se retrouve répartie dans 5 fractions :

- Le rétentat de la membrane Tami 50 kDa : **44 %**
- Le rétentat de la membrane Millipore 10 kDa : **17 %**
- Le rétentat de la membrane Millipore 1 kDa : **26 %**
- Le rétentat de la membrane Osmonic GE Sepa™ GH : **6 %**
- Le perméat de la membrane Osmonic GE Sepa™ GH : **6 %**

En effet, à l'issue de la première étape de filtration sur la membrane Tami 50 kDa (étape de clarification), nous avons obtenu 5,7 L de jus clarifié à partir de 9,2 L jus brut. Le perméat obtenu renferme  $125 \text{ g.L}^{-1}$  de matière sèche, principalement constituée par des fructanes. Il est important de noter que bien que seul 10% de la matière sèche initiale soient retenus, la turbidité du perméat a été divisée par 17. On retrouve donc dans le rétentat, une grande partie des composés responsables de la turbidité que l'on souhaitait éliminer mais ce rétentat renferme aussi des fructanes et des FOS. Une étape de diafiltration est indispensable si l'on souhaite améliorer les rendements de production.

3,8 L de ce jus clarifié (perméat) ont ensuite été filtrés sur une membrane Millipore 10 kDa-CR ce qui nous a permis d'obtenir 3,2 L de perméat et 0,6 L de rétentat. Le rétentat enrichi en fructanes de  $\text{DP} > 40$  comme on peut le voir sur la Figure 66, renferme  $248 \text{ g.L}^{-1}$  de matière sèche et le perméat  $99 \text{ g.L}^{-1}$ .

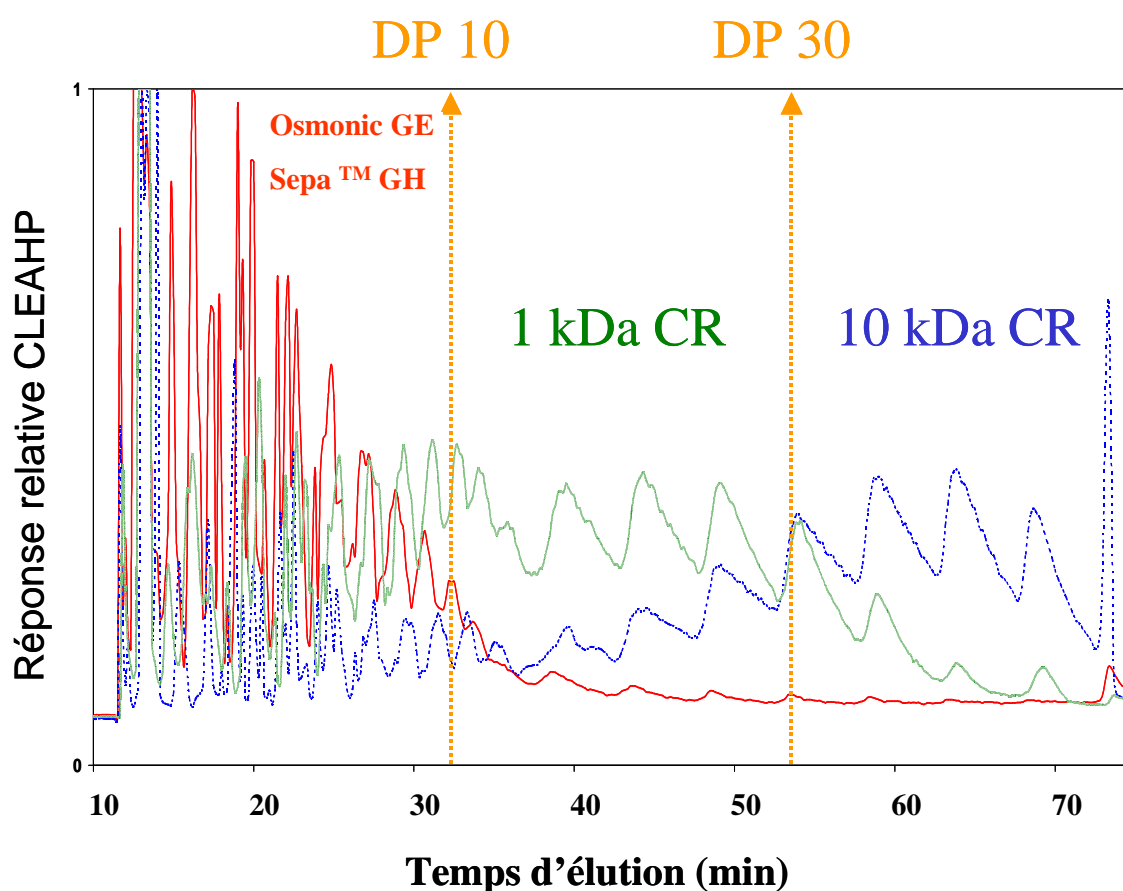


Figure 66 : Profils CLEAHP des rétentats obtenus lors du fractionnement des fructanes d'*Agave tequilana* par filtrations successives sur membranes Millipore 10 et 1 kDa et Osmonic GE Sepa™ GH.



Du perméat obtenu au cours de cette deuxième étape, 3L ont été filtrés sur une membrane Millipore 1 kDa-CR, ce qui nous a permis d'obtenir 2,2 L de perméat et 0,8 L rétentat. Comme on peut le constater sur la Figure 66, ce rétentat dont la concentration en matière sèche est égale à  $255\text{g.L}^{-1}$  (soit 26 % de la matière sèche initiale) contient majoritairement des fructanes de DP intermédiaire (10-40).

Enfin, 1,9 L de perméat obtenus au cours de cette troisième étape ont été filtrés sur une membrane Osmonic GE Sepa™ GH afin d'obtenir une fraction enrichie en FOS. Cet objectif a été atteint comme on peut le voir sur Figure 66. Les 0,4 L de rétentat obtenu présentent un extrait sec de  $102\text{ g.L}^{-1}$  (soit 6 % de la matière sèche initiale) alors que le perméat (1,5L) contenant que  $27\text{ g.L}^{-1}$  de matière sèche, est composé principalement de mono et disaccharides.

Le fractionnement des fructanes contenus dans le jus clarifié a donc été rendu possible par la mise en œuvre successive de 3 étapes de filtration. Toutefois, par manque de temps, il ne nous a pas été possible d'étudier la purification de ces fractions. Comme on peut le voir sur la Figure 66, outre les fructanes d'intérêt, on retrouve dans chaque fraction, des fructanes de DP inférieur qu'il aurait été possible d'éliminer par la mise en œuvre de la filtration en mode diafiltration.

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche plus général dont l'objectif principal est de proposer de nouvelles alternatives à l'utilisation des agaves cultivées dans les régions arides et semi arides du Mexique, notamment l'agave pulquéro (utilisée pour la production d'aguamiel et de pulque) et l'*Agave tequilana* (utilisé pour la production de Tequila). Il comprend à la fois un travail de caractérisation de la matière première, mais également une étude des potentialités des technologies membranaires pour le fractionnement et la purification industrielle des fructanes, principaux composés d'intérêts des jus d'agave.

Nous avons en effet pu montrer que l'aguamiel, jus obtenu par grattage bi-quotidien pendant 4 à 6 mois des cœurs d'agave pulquéro matures, contient 11,5% (p/p) de matière sèche constituée principalement par des sucres (67% dont 48% de fructose, 39% de glucose et 13% de saccharose), des fructanes (10%), des protéines (3%) et des sels minéraux (3% dont principalement du potassium et du calcium). Malgré quelques petites variations, la composition de l'aguamiel est stable tout au long de la période de production. L'absence de variabilité dans la composition de cette matière première devrait faciliter sa commercialisation à l'échelle industrielle sous forme de boissons.

L'aguamiel contient également à 0,3 g.L<sup>-1</sup> d'acides aminés libres parmi lesquels on retrouve tous les AA essentiels à l'exception de la méthionine. La présence d'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) connu comme étant le principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux sympathique a été mise en évidence et estimée à 26 mg.L<sup>-1</sup>. Ces concentrations sont suffisantes pour considérer l'aguamiel comme une matière première d'intérêt pour l'élaboration de boissons fonctionnelles. Toutefois, en raison de la présence d'enzymes hydrolytiques (invertase, inulinase...) toujours actives même après 5 mois de stockage à -18°C, il est conseillé pour conserver dans l'aguamiel des fructanes de haut DP, de prévoir un traitement d'inactivation adéquat pour éviter toute dégradation enzymatique post-récolte et conserver au jus toutes ses qualités nutritionnelles.

Cependant si la production industrielle de boisson à base d'aguamiel est envisageable et attractive commercialement, la rentabilité économique d'un procédé de purification de composés d'intérêt tels que les fructanes par technologie membranaire à partir de cette matière première risque d'être limitée en raison de la faible concentration de ces composés dans l'aguamiel. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à l'extraction des fructanes à partir des coeurs d'agave pulquéro et nous les avons comparés à ceux extraits d'*Agave tequilana*.

Nous avons ainsi pu observer, en comparant la concentration en fructanes d'extraits de cœur d'agave pulquéro pris en début et en fin de la production d'aguamiel, que cette concentration chute au cours du temps de 21 g.kg<sup>-1</sup> à 8,5 g.kg<sup>-1</sup>. Il a été également mis en évidence une migration des fructanes des feuilles vers le cœur d'agave. Par conséquent, les coeurs d'agave en fin de production d'aguamiel, qui jusqu'à ce jour sont abandonnés dans les champs, pourraient être utilisés pour l'extraction de fructanes, cela permettra d'augmenter la rentabilité de cette activité.

Nous avons réalisé des analyses de composition et de structure des fructanes extraits des coeurs d'agave. Les résultats obtenus ont mis en évidence la présence dans l'extrait d'agave pulquéro de structures de type inuline, lévulane et agavine. En raison de la complexité des structures présentes, il n'a pas été possible de séparer parfaitement les fructanes des agaves par chromatographie liquide haute performance d'échange d'anions (CLEAHP) sur système Dionex avec une détection ampérométrique pulsée et ce malgré la mise au point d'un gradient spécifique. Toutefois le degré de séparation obtenu a été suffisant pour caractériser les échantillons de jus d'agave d'une part et évaluer l'efficacité des étapes de séparation membranaire lors du fractionnement des agavines d'autre part.

La séparation des agavines par paquets correspondant à un DP<sub>moyen</sub> en CLEAHP, nous a ainsi permis de donner les profils de polydispersité des fructanes. Les DP<sub>max</sub> des fructanes d'agave pulquéro d'*Agave tequilana* ont été estimés respectivement à 25 et 80 en comparaison à des témoins de fructo-oligosaccharides (FOS) et d'inuline commerciale.

Comme les extraits de cœur d'*Agave tequilana* renferment des fructanes présentant une plus large polydispersité (DP de 3 à 80), la mise au point d'un procédé de fractionnement

des fructanes d'agave par technique à membrane a été réalisée sur cette matière première et a fait l'objet de la seconde partie de cette thèse.

Des premiers essais de filtration d'une solution modèle d'agavine préparée à partir d'une poudre commerciale (FRUCTAGAVE PR-95) nous a permis d'identifier les membranes susceptibles de correspondre aux objectifs de séparation fixés, à savoir préparer à partir d'un mélange de fructanes, trois fractions renfermant respectivement des fructanes de haut DP ( $DP > 40$ ), des fructanes de DP intermédiaires ( $10 < DP < 40$ ) et des fructo-oligosaccharides (FOS) dont le DP est inférieur à 10 mais ne contenant plus de mono et disaccharides. Puis les résultats obtenus sur solution modèles ont été validés par des essais de filtration de jus brut d'*Agave tequilana*.

Les premiers résultats ont montré qu'il n'est pas possible sur la seule base des informations données par les fabricants de membranes de prévoir les performances d'une opération de filtration. En effet des essais de filtration d'une solution modèle à 2 % d'agavine réalisés sur 5 membranes organiques élaborées à partir d'un même polymère (PES) et affichant un même seuil de coupure nominal (10 kDa) ont montré que les valeurs de flux de perméation mesurés à FRV 1,05, varient de 17 à 145  $L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$ . Le % de colmatage irréversible est lui aussi très différent d'une membrane à l'autre et on a même constaté que la membrane la plus perméable présente le même % de colmatage (57%) que la membrane la moins perméable. La réalisation d'une étude à l'échelle du laboratoire est donc indispensable avant d'envisager tout investissement dans un procédé membranaire.

A l'issue des différents essais de filtration réalisés, nous avons retenu 4 membranes dont la mise en œuvre successive a permis de répondre à nos objectifs.

Il a été ainsi envisagé dans un premier temps de clarifier la solution d'agavine sur une membrane Tami 15 kDa afin de retenir les composés macromoléculaires. Cependant lors des essais sur solution réelle, la présence de composés colmatants inexistant dans la solution modèle nous a conduit à choisir une membrane de diamètre de pore supérieur à savoir une membrane Tami 50 kDa.

Le jus clarifié reffermant principalement des fructanes a été ensuite fractionné par la mise en œuvre successive de 3 étapes de filtration sur membrane. La première membrane

mise en œuvre est une membrane Millipore 10 kDa-CR et la seconde une membrane Millipore 1 kDa-CR. Ces 2 membranes ont été choisies en raison de leur sélectivité mais aussi en raison de leur nature chimique. La cellulose régénérée ne présente pas ou presque pas d'interactions avec les composés polysaccharidiques. Pour la dernière étape, visant l'élimination des mono et disaccharides des FOS, une membrane d'ultrafiltration basse a été retenue à savoir la membrane Osmonic GE Sepa™ GH.

Ainsi nous avons pu obtenir à partir d'une solution de jus brut d'*Agave tequilana* produit industriellement:

- une fraction enrichie en fructanes de haut DP ( $DP > 40$ ) correspondant au rétentat de la membrane Millipore 10 kDa-CR
- une fraction enrichie en fructanes de DP intermédiaire ( $10 < DP < 40$ ) correspondant au rétentat de la membrane Millipore 1 kDa-CR.
- une fraction enrichie en FOS correspondant au rétentat de la membrane Osmonic GE Sepa™ GH.

La dernière fraction (le perméat de la membrane Osmonic GE Sepa™ GH riche en mono et disaccharides) présente un intérêt économique moindre mais pourra tout de même être valorisée en raison de son pouvoir sucrant naturel.

Les résultats majeurs acquis au cours de cette étude concernant à la fois la connaissance de la matière première et les potentialités des techniques membranaires en vue de la valorisation de celle-ci permettent d'orienter les recherches futures selon 2 axes principaux concernant les aspects procédés d'une part et les aspects matière première d'autre part.

Tout d'abord l'étude du procédé doit être poursuivie. Si les objectifs fixés pour cette étude ont bien été atteints, il reste encore du travail à réaliser pour valider son intérêt industriel.

En effet, les différentes fractions obtenues ne sont pas pures. Par manque de temps il n'a pas été possible de réaliser des essais en mode diafiltration. Or ce mode de conduite devrait permettre d'améliorer la qualité des produits et les rendements d'extraction. Des essais devront donc être réalisés en ce sens.

De même, si l'étape de clarification et en particulier l'incidence des paramètres opératoires sur les performances de cette étape ont été étudiés de façon plus approfondie, ce n'est pas le cas des autres étapes. Ces études devront donc être envisagées afin de déterminer les conditions optimales de fonctionnement pour chacune de ces filtrations tangentielles.

De plus, il sera également nécessaire de compléter cette étude de faisabilité à l'échelle du laboratoire par une étude de modélisation et simulation en vue d'établir le dimensionnement de l'installation à l'échelle industrielle.

Enfin, une étude de coût sera nécessaire pour évaluer la rentabilité du procédé et son intérêt économique. Les coûts de production des fructanes devront être comparés à ceux des procédés existants.

Concernant la matière première, nous nous sommes limité dans le cadre de cette étude à 2 variétés d'agave : l'agave pulquéro et l'*Agave tequilana*. Or il existe au Mexique, d'autres variétés de plantes adaptées aux conditions climatiques des zones arides et semi-arides qui stockent également leur réserve énergétique sous forme de fructanes. Grâce aux connaissances acquises ici, il va être possible de rechercher si parmi ces plantes, il n'en existe pas de plus intéressantes vis-à-vis de la production de fructanes. Cela favoriserait le maintien ou le retour à la terre de cultivateurs assurés grâce à l'intérêt économique des fructanes, de revenus financiers suffisants.

Par ailleurs, nous avons mis en évidence la complexité des structures des fructanes issus d'agave. Par manque de temps, cette étude n'a pu être menée à son terme. Il serait intéressant sur le plan analytique de pouvoir isoler ces différents types de fructanes afin de les caractériser au mieux mais surtout d'identifier leurs propriétés spécifiques et notamment rhéologiques. Cela devrait permettre à terme de trouver pour ce type de molécules de nouvelles applications dont l'intérêt économique conforterait les besoins et la rentabilité du procédé membranaire de purification mis en place.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abrams, S. A.; Griffin, I. J. and Hawthorne, K. M. (2007). "Young adolescents who respond to an inulin-type fructan substantially increase total absorbed calcium and daily calcium accretion to the skeleton." *J. Nutr.* **137**(11): 2524S-2526S.
- Abreu, F.; Perez, A. M.; Dornier, M. and Reynes, M. (2005). "Potentialités de la microfiltration tangentielle sur membranes minérales pour la clarification du jus de pomme de cajou." *Fruits* **60** 33-40
- Abundis-Vargas, B. (2007). "Monografía del Agave pulquero." Retrieved Mars, 2008. <http://www.sdr.gob.mx/beta1/contenidos/CadenasAgropecuarias/docs/490148.235.138.1321-08-2007MONOGRAFIA%20%20DE%20AGAVE%20PULQUERO.pdf>.
- Akin, M. B.; Akin, M. S. and Kirmaci, Z. (2007). "Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream." *Food Chem.* **104**(1): 93-99.
- Akoum, O.; Richfield, D.; Jaffrin, M. Y.; Ding, L. H. and Swart, P. (2006). "Recovery of trypsin inhibitor and soy milk protein concentration by dynamic filtration." *J. Memb. Sci.* **279**(1-2): 291-300.
- Albersheim, P.; Nevins, D. J.; English, P. D. and Karr, A. (1967). "A method for the analysis of sugars in plant cell wall polysaccharides by gas liquid chromatography." *Carbohydr. Res.* **5**: 340-345.
- Alfaro-Rojas, G.; Legaria-Solano, J. P. and Rodríguez-Pérez, J. E. (2007). "Diversidad genética en poblaciones de agaves pulqueros (agave spp.) del nororiente del Estado de México." *Rev. Fitotec. Mexicana* **30**(1).
- Alonso Gutierrez, M. D. L. S. (2005). Valorisation de la bagasse de l'Agave tequilana W. cv azul : caractérisation, étude de la digestibilité et de la fermentation des sucres. (Valorization of agave tequilana W.cv azul bagasse : characterization, studies on digestibility and sugars fermentation.). *Sciences des Agroressources*. Toulouse l'Institut National Polytechnique de Toulouse
- Andrade-Cetto, A. and Heinrich, M. (2005). "Review Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes." *J. Ethnopharm.* **99**: 325-348.
- Antošová, M.; Polakovič, M. and Bálež, V. (1999). "Separation of fructooligosaccharides on a cation exchange HPLC column in silver form with refractometric detection." *Biotechnol.Tech.* **13**: 889-892.
- A. P. G. (1998). "classification phylogénétique." classification botanique des angiospermes établie selon les travaux de l'Angiosperms Phylogeny Group Retrieved April 2008.
- Arrizaga, S.; Ezcurra, E.; Peters, E.; Ramirez, D. A. F. and Vega, E. (2000). "Pollination ecology of agave macroacantha (agavaceae) in a mexican tropical desert. I. floral biology and pollination mechanisms." *Am. J. Bot.* **87**(7): 1004-1010.
- Aryana, K. J.; Plauche, S.; Rao, R. M.; McGrew, P. and Shah, N. P. (2007). "Fat-free plain yogurt manufactured with inulins of various chain lengths and Lactobacillus acidophilus." *J. Food Sci.* **72**(3): M79-84.
- Aspinall, G. O. and Gupta, P. C. (1959). "The structure of the fructosan from Agave vera-cruz Mill. ." *J. Am. Chem. Soc.* **81**: 718-722.

- Balakrishnan, M.; Dua, M. and Bhagat, J. J. (2000). "Effect of operating parameters on sugarcane juice ultrafiltration: results of a field experience." Sep. Purif. Technol. **19**(3): 209-220.
- Bancal, P.; Carpita, N. C. and Gaudille, J. P. (1992). "Differences in fructan accumulated in induced and field-grown wheat plants: an elongation-trimming pathway for their synthesis." New. Phytol. **120**: 313-321.
- Barreto-Bergter, E.; Hogge, L. and Gorin, P. A. J. (1981). "Gas-Liquid Chromatography of Partially Methylated Alditol Acetates on Capillary Columns of Ov 17 And Ov225." Carbohydr. Res. **97**: 147-150
- Basic, A.; Harris, P. J.; Hak, E. and Clarke, A. E. (1984). "Capillary Gas Chromatography of Partially Methylated Alditol Acetates on a High-Polarity Bonded Phase Vitreous-Silica Column. ." J.Chromatogr. **315**: 373-377.
- Bathia, I. S. and Nandra, K. S. (1979). "Studies on fructosyltransferase from Agave americana " Phytochem. **18**: 923-927.
- Belleville, M.-P.; Brillouet, J. M.; Tarodo De La Fuente, B. and Moutounet, M. (1990). " Polysaccharide effects on cross-flow microfiltration of two red wines with a microporous alumina membrane " J. Food Sci. **55** (6 ): 1598-1602.
- Belleville, M. P.; Lozano, P.; Iborra, J. L. and Rios, G. M. (2001). "Preparation of hybrid membranes for enzymatic reaction." Sep. Purif. Technol. **25**(1-3): 229-233.
- Berghofer, E.; Cramer, A.; Schmidt, V. and M. Veigl (1993). Pilot-scale production of inulin from chicory roots and its use in foodstuffs. Elsivier. Amsterdam. **XP0002058196**.
- Bigot, A. (1997). "L'inuline et ses applications diverses." Int. Food Ingrid. **2**: 22-23.
- Blomberg, L. (2000). Tequila, Mezcal y pulque lo auténtico Mexicano. México, Mexique., Ed. Diana.
- Boissier, B.; Lutin, F.; Moutounet, M. and Vernhet, A. (2008). "Particles deposition during the cross-flow microfiltration of red wines--incidence of the hydrodynamic conditions and of the yeast to fines ratio." Chem. Eng. Proc. **47**(3): 276-286.
- Bonnett, G. D.; Sims, I. M.; John, J. A. S. and Simpson, R. J. (1994). "Purification and characterization of fructans with b-2,1- and b-2,6-glycosidic linkages suitable for enzyme studies." New. Phytol. **127**: 261-269.
- Bonnett, G. D.; Sims, I. M.; Simpson, R. J. and Cairns, A. J. (1997). "Structural diversity of fructan in relation to the taxonomy of the Poaceae." New. Phytol. **136**: 11-17.
- Bouchereau, A.; Aziz, A.; Larher, F. and Martin-Tanguy, J. (1994). "Polyamines and environmental challenges: recent development. " Plant. Physiol. **106**: 329-336.
- Boussu, K.; Belpaire, A.; Volodin, A.; Van Haesendonck, C.; Van Der Meeren, P.; Vandecasteele, C. and Van Der Bruggen, B. (2007). "Influence of membrane and colloid characteristics on fouling of nanofiltration membranes." J. Memb. Sci. **289**(1-2): 220-230.
- Bruzzes, E.; Volpicelli, M.; Squaglia, M.; Tartaglione, A. and Guarino, A. (2006). "Impact of prebiotics on human health." Papers from the 3rd International Congress on Probiotics, Prebiotics and New Foods **38**(2): S283-S287.
- Campbell, J. M.; Bauer, L. L.; Fahey, G. C.; Hogart, A. J. C. L.; Wolf, B. W. and Hunter, D. E. (1997). "Selected Fructooligosaccharide (1-Kestose, Nystose, and 1F--Fructofuranosylnystose) Composition of Foods and Feeds. ." J. Agric. Food Chem. **45** 3076-3082.
- Carpita, N. C.; Kanabus, J. and Housley, T. L. (1989). "Linkage structure of fructans and fructan oligomers from Triticum aestivum and Festuca arundinaceae leaves " J. Plant. Physiol. **134**: 162-168.
- Cedeno, M. (1995). "Tequila production." Crit. Rev. Biotechnol. **15**(1): 1-11.



- Cervantes-Martinez, J.; Flores-Hernandez, R.; Rodriguez-Garay, B. and Santacruz-Ruvalcaba, F. (2002). "Detection of bacterial infection of agave plants by laser-induced fluorescence." *Appl. Opt.* **41**(13): 2541-5.
- Cervantes-Ramírez, M. C. (2002). Plantas de importancia económica en las zonas áridas y semiáridas de México. México, Instituto de Geografía UNAM-MEXICO.
- Chatterton, N. J.; Harrison, P. A.; Bennett, J. H. and Asay, K. H. (1989). "Carbohydrates partitioning in 185 accessions of gramineae grown under warm and cool temperatures. ." *J. Plant Physiol.* **134**(169-179).
- Chatterton, N. J.; Harrison, P. A.; Thornley, W. R. and Draper, E. A. (1990). "Oligosaccharides in foliage of Agropyron, Bromus, Dactylis, Festuca, Lolium and Phleum. ." *New. Phytologist* **114**: 167 -171.
- Cherbut, C. (2002). "Inulin and oligofructose in the dietary fibre concept." *Br. J. Nutr.* **87** (2): S159-62.
- Cheryan, M. (1998). Ultrafiltración and Microfiltration Handbook. Pennsylvania, USA., Technomic Publishing Co. Inc.
- Corradini, C.; Bianchi, F.; Matteuzzi, D.; Amoretti, A.; Rossi, M. and Zanoni, S. (2004). "High-performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection and capillary zone electrophoresis with indirect ultra violet detection as powerful tools to evaluate prebiotic properties of fructooligosaccharides and inulin." *J. Chromatogr.* **1054**(1-2): 165-73.
- Coxam, V. (2007). "Current data with inulin-type fructans and calcium, targeting bone health in adults." *J. Nutr.* **137**(11 Suppl): 2527S-2533S.
- Cravioto, B. R.; Lockhart, E. E.; Miranda, F. P.; Harris, R. S. and (1945). "Contenido nutritivo de ciertos típicos alimentos mexicanos / Nutrient content of typical Mexican foods." *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana* **24**(8): 685-695.
- Cruz-Guerrero, A. E. Olvera, J. L.; García-Garibay, M.; Gómez-Ruiz, L. (2006). "Inulinase-hyperproducing strains of Kluyveromyces sp. isolated from aguamiel (Agave sap) and pulque." *World J. Microb. Biotechnol.* **22**: 115–117.
- Darnon, E. (2001). Intensification des procédés de purification de milieux biologiques par intégration de l'ultrafiltration. Génie des procédés. Montpellier, Université Montpellier II. **doctorat** 212.
- De Leon-Rodriguez, A.; Barba De La Rosa, A. P.; Escalante-Minakata, P. and Blaschek, H. P. (2008). "Optimization of fermentation conditions for the production of the mezcal from Agave salmiana using response surface methodology." *Chem. Eng. Proc.* **47**(1): 76-82.
- De Leon-Rodriguez, A.; Gonzalez-Hernandez, L.; Barba De La Rosa, A. P.; Escalante-Minakata, P. and Lopez, M. G. (2006). "Characterization of volatile compounds of Mezcal, an ethnic alcoholic beverage obtained from Agave salmiana." *J. Agric. Food Chem.* **54**(4): 1337-41.
- Diaz-Montano, D. M.; Delia, M. L.; Estarron-Espinosa, M. and Strehaiano, P. (2008). "Fermentative capability and aroma compound production by yeast strains isolated from Agave tequilana weber juice." *Enz. Microb. Technol.* **42**(7): 535-634.
- Donkor, O. N.; Henriksson, A.; Vasiljevic, T. and Shah, N. P. (2007). "Rheological properties and sensory characteristics of set-type soy yogurt." *J. Agric. Food Chem.* **55**(24): 9868-76.
- Dorland, L.; Kamerling, J. P.; Vliegthart, J. F. G. and Satyanarayana, N. (1977). "Oligosaccharides isolated from Agave vera-cruz." *Carbohyd. Res.* **54**: 275-284
- Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A. and Smith, F. (1956). "Colorimetric method for determination of sugars and related substances." *Anal. Chem.* **28**: 350-356.

- Dutcosky, S. D.; Grossmann, M. V. E.; Silva, R. S. S. F. and Welsch, A. K. (2006). "Combined sensory optimization of a prebiotic cereal product using multicomponent mixture experiments." Food Chem. **98**(4): 630-638.
- Dykins, F. A. and Englis, D. T. (1933). "Production of a Palatable Artichoke Sirup " Ind. Eng. Chem. **25**(10): 1165-1168.
- Dysseler, P. and Hoffem, D. (1995). "Inulin, an alternative dietary fibre. Properties and quantitative analysis." Eur. J. Clin. Nutr. **49** (3): S145-52.
- Eguiarte, L. E. (1995). "Hutchinson (Agavales) vs. Huber y Dahlgren (Asparagales): análisis moleculares sobre la filogenia y evolución de la familia *Agavaceae sensu* Hutchinson dentro de las monocotiledóneas." Bol.Soc.Bot. México **56**: 45-56.
- Engel, E.; Lombardot, J.-B.; Gareme, A.; Leconte, N.; Septier, C.; Le Quere, J.-L. and Salles, C. (2002). "Fractionation of the water-soluble extract of a cheese made from goats' milk by filtration methods: behaviour of fat and volatile compounds." Int. Dairy J. **12**(7): 609-619.
- Ernst, M.; Chatterton, N. J. and Harrison, P. A. (1996). "Purification and characterization of a new fructan series from species of Asteraceae." New. Phytol. **132**: 63-66.
- Escalante, A.; Rodríguez, M.; Martínez, A.; Lopez-Mungia, A.; Bolívar, A. and Garcia, G. (2004). "Characterization of bacterial diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. ." FEMS Microbiol. Lett. **235** 273–279.
- Evans, P. J.; Bird, M. R.; Pihlajamaki, A. and Nystrom, M. (2008). "The influence of hydrophobicity, roughness and charge upon ultrafiltration membranes for black tea liquor clarification." J. Memb. Sci. **313**(1-2): 250-262.
- Fairweather., C. (1954). Production and fractionation of dextrans. Patent. U.S. **716,660, 1954.**
- Falk, M. (2006). Delisting of Agave arizonica (Arizona agave) from the Federal list of endangered and threatened wildlife and plants. Tucson, Arizona, <http://www.fws.gov/policy/library/E6-8643.html>.
- FAO (2007). Technical meeting on prebiotics. Food and Agriculture Organization of the United Nations. F. Q. a. S. S. (AGNS), FAO. **September 15-16.**
- Farine, S.; Versluis, C.; Bonnici, P. J.; Heck, A.; Peschet, J. L.; Puigserver, A. and Biagini, A. (2001). "Separation and identification of enzymatic sucrose hydrolysis products by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection." J. Chromatogr. A **920**(1-2): 299-308.
- Fernández-Anderson, L. E. (2005). Fitoquímica del *Agave salmiana*. Química y Biología. Cholula, Puebla, México, Universidad de las Americas Puebla. **Licenciatura.**
- Finke, B.; Stahl, B.; Pritschet, M.; Facius, D.; Wolfgang, J. and Boehm, G. (2002). "Preparative continuous annular chromatography (P-CAC) enables the large-scale fractionation of fructans." J. Agric. Food Chem. **50**(17): 4743-8.
- Flickinger, E. A. and Fahey, G. C., Jr. (2002). "Pet food and feed applications of inulin, oligofructose and other oligosaccharides." Br. J. Nutr. **87** (2): S297-300.
- Flickinger, E. A.; Schreijen, E. M.; Patil, A. R.; Hussein, H. S.; Grieshop, C. M.; Merchen, N. R. and Fahey, G. C., Jr. (2003). "Nutrient digestibilities, microbial populations, and protein catabolites as affected by fructan supplementation of dog diets." J. Anim. Sci. **81**(8): 2008-18.
- Frank, B. P. and Belfort, G. (2003). "Polysaccharides and sticky membrane surfaces: critical ionic effects." J. Memb. Sci. **212**(1-2): 205-212.
- Freeman, C. E.; Tiffany, R. S. and Reid, W. H. (1977). "Germination Responses of *Agave lecheguilla*, *A. parryi*, and *Fouquieria splendens*." Southwestern Natur. **22**(2): 195-204.

- Gabino, F.; Belleville, M. P.; Preziosi-Belloy, L.; Dornier, M. and Sanchez, J. (2007). "Evaluation of the cleaning of a new hydrophobic membrane for osmotic evaporation." *Sep. Purif. Technol.* **55**(2): 191-197.
- García-Mendoza, A.; Linares, E.; Dávila, P.; Chiang, F.; Bye, R. and Elias, T. (1995). *Riqueza y endemismo de la familia Agavaceae en México*. D.F. Mexico Instituto de Biología UNAM.
- Gergely, S.; Bekassy-Molnar, E. and Vatai, G. (2003). "The use of multiobjective optimization to improve wine filtration." *J. Food Eng.* **58**(4): 311-316.
- Gonzalez-Tomas, L.; Coll-Marques, J. and Costell, E. (In Press). "Viscoelasticity of inulin-starch-based dairy systems. Influence of inulin average chain length." *Food Hydrocol.*: Available online 8 August 2007.
- Goulas, A. K.; Kapasakalidis, P. G.; Sinclair, H. R.; Rastall, R. A. and Grandison, A. S. (2002). "Purification of oligosaccharides by nanofiltration." *J. Memb. Sci.* **209**(1): 321-335.
- Granados-Sánchez, D. (1993). Cultura y utilización del maguey. *Los agaves en México*. Chapingo, México, Universidad Autónoma de Chapingo, : 11-22.
- Grelier, P.; Rosenberger, S. and Tazi-Pain, A. (2006). "Influence of sludge retention time on membrane bioreactor hydraulic performance." *Desalination* **192**(1-3): 10-17.
- Guarner, F. (2005). "Inulin and oligofructose: impact on intestinal diseases and disorders." *Br. J. Nutr.* **93**(1): S61-5.
- Gumi, T.; Fernandez-Delgado Albacete, J.; Paolucci-Jeanjean, D.; Belleville, M.-P. and Rios, G. M. (2008). "Study of the influence of the hydrodynamic parameters on the performance of an enzymatic membrane reactor." *J. Membr. Sci.* **311**(1-2): 147-152.
- Hakomori, S. I. (1964). "A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide." *J. Biochem.* **55**: 205-208.
- He, Y.; Ji, Z. and Li, S. (2007). "Effective clarification of apple juice using membrane filtration without enzyme and pasteurization pretreatment." *Sep. Purif. Technol.* **57**(2): 366-373.
- Hendry, G. A. F. and Wallace, R. K. (1993). The origin, distribution, and evolutionary significance of fructans. *Science and Technology of Fructans*. C. Press. Boca Raton, FL, Suzuki, M.; Chatterton, N. J. : 119-139.
- Hilal, N.; Al-Abri, M. and Al-Hinai, H. (2007). "Characterization and retention of UF membranes using PEG, HS and polyelectrolytes." *Desalination* **206**(1-3): 568-578.
- Hinojosa, R. A. (2004). "El TLCAN y los principales problemas en las cadenas productivas de algunos productos industriales: agave tequilero, henequén y algodón hueso." *universidad autónoma* <http://www.economia.gob.mx/pics/p/p1763/Industriales.pdf>. 2008.
- Holloway, L.; Moynihan, S.; Abrams, S. A.; Kent, K.; Hsu, A. R. and Friedlander, A. L. (2007). "Effects of oligofructose-enriched inulin on intestinal absorption of calcium and magnesium and bone turnover markers in postmenopausal women." *Br. J. Nutr.* **97**(2): 365-72.
- Huebner, J.; Wehling, R. L.; Parkhurst, A. and Hutkins, R. W. (2008). "Effect of processing conditions on the prebiotic activity of commercial prebiotics." *Int. Dairy J.* **18**(3): 287-293.
- Inoue, K.; Shirai, T.; Ochiai, H.; Kasao, M.; Hayakawa, K.; Kimura, M. and Sansawa, H. (2003). "Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives." *Eur. J. Clin. Nutr.* **57** 490-495.
- Islas-Lopez, M. A.; Sanjuan-Galindo, R.; Rodriguez-Hernandez, A. I. and Chavarria-Hernandez, N. (2005). "Monoxenic production of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* using culture media containing agave juice (aguamiel) from

- Mexican maguey-pulquero (*Agave* spp). Effects of the contents of nitrogen, carbohydrates and fat on infective juvenile production." Appl. Microbiol. Biotechnol. **68**(1): 91-7.
- Itaya, N. M.; Buckeridge, M. S. and Figueiredo-Ribeiro, R. C. L. (1997). "Biosynthesis in vitro of highmolecular- mass fructan by cell-free extracts from tuberous roots of *Viguiera discolor* (Asteraceae). ." New. Phytologist. **136** 53-60.
- James, B. J.; Jing, Y. and Dong Chen, X. (2003). "Membrane fouling during filtration of milk--a microstructural study." J. Food Eng. **60**(4): 431-437.
- Jansson, P. E.; Kenne, L.; Liedgren, H.; Lindberg, B. and Lonngren, L. (1976). "A practical guide to methylation analysis of carbohydrates " Chem. Commun. Univers. Stockholm. **8**: 1-20.
- Jones, K. L. and O'melia, C. R. (2000). "Protein and humic acid adsorption onto hydrophilic membrane surfaces: effects of pH and ionic strength." J. Membrane Sci. **165**(1): 31-46.
- José-Jacinto, R. and Garcia-Moya, E. (1995). "Fijación de CO<sub>2</sub> en *Agave angustifolia* Haw." Bol.Soc.Bot. México **57**: 5-10.
- Jung, K. H.; Kim, J. H.; Jeon, Y. J. and Lee, J. H. (1993). "Production of high fructo-oligosaccharide syrup with two enzyme system of fructosyltransferase and glucose oxidase." Biotechnol. Lett. **15**: 65-70.
- Kaeselev, B.; Pieracci, J. and Belfort, G. (2001). "Photoinduced grafting of ultrafiltration membranes: comparison of poly(ether sulfone) and poly(sulfone)." J. Memb. Sci. **194**(2): 245-261.
- Kallioinen, M.; Pekkarinen, M.; Manttari, M.; Nystrom, M. and Nuortila-Jokinen, J. (2006). "Stability of two different regenerated cellulose ultrafiltration membranes under varying solution temperature." Desalination **199**(1-3): 204-206.
- Kamada, T. N., M.; Nabetani, H.; Saglam, N.; Iwamoto, S. (2002). "Availability of membrane technology for purifying and concentrating oligosaccharides." Europ. Food Res. Technol. **214**(5): 435-440.
- Kaplan, H. and Hutkins, R. W. (2003). "Metabolism of fructooligosaccharides by *Lactobacillus paracasei* 1195." Appl. Environ. Microbiol. **69**(4): 2217-22.
- Katsoufidou, K.; Yiantsios, S. G. and Karabelas, A. J. (2007). "Experimental study of ultrafiltration membrane fouling by sodium alginate and flux recovery by backwashing." J. Membr. Sci. **300**(1-2): 137-146.
- Kilian, S. G.; Kritzinger, S. M.; Rycroft, C. and Gibson, G. R. (2000). "The effects of the novel bifidogenic trisaccharide, neokestose, on the human colonic microbiota. ." World J. Microbiol. Biotechnol. **18**: 637-644.
- Kochkodan, V.; Tsarenko, S.; Potapchenko, N.; Kosinova, V. and Goncharuk, V. (2008). "Adhesion of microorganisms to polymer membranes: a photobactericidal effect of surface treatment with TiO<sub>2</sub>." Desalination **220**(1-3): 380-385.
- Kocsis, L.; Liebhard, P. and Praznik, W. (2007). "Effect of Seasonal Changes on Content and Profile of Soluble Carbohydrates in Tubers of Different Varieties of Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.)." Agric. Food Chem. **55**(23): 9401-9408.
- Kolida, S. and Gibson, G. R. (2007). "Prebiotic capacity of inulin-type fructans." J. Nutr. **137**(11 ): 2503S-2506S.
- Kolida, S.; Tuohy, K. and Gibson, G. R. (2002). "Prebiotic effects of inulin and oligofructose." Br. J. Nutr. **87**(2): S193-7.
- Koops, A. J. and Jonker, H. H. (1996). "Purification and Characterization of the Enzymes of Fructan Biosynthesis in Tubers of *Helianthus tuberosus* Colombia (II. Purification of Sucrose:Sucrose 1-Fructosyltransferase and Reconstitution of Fructan Synthesis in

- Vitro with Purified Sucrose:Sucrose 1-Fructosyltransferase and Fructan:Fructan 1-Fructosyltransferase)." Plant Physiol. **110**(4): 1167-1175.
- Kritzinger, S. M.; Kilian, S. G.; Potgieter, M. A. and Du Preez, J. C. (2003). "The effect of production parameters on the synthesis of the prebiotic trisaccharide, neokestose, by *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Phaffia rhodozyma)." Enz. Microb. Technol. **32**(6): 728-737.
- Kunz, M.; Munir, M. and Vogel, M. (1995). Process for the preparation of long-chain inulin with inulinase. U. S. Patent. US Patent. **5,478,732**.
- L'homme, C.; Peschet, J. L.; Puigserver, A. and Biagini, A. (2001). "Evaluation of fructans in various fresh and stewed fruits by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection." J. Chromatogr. A **920**(1-2): 291-7.
- Lajolo, F. M. and Wenzel De Menezes, E. (2006). Carbohidratos en Alimentos Regionales Iberoamericanos. São Paulo, Editora da Universidade de São Paulo.
- Laurenzo, K. S.; Navia, J. L. and S., N. D. (1999). Preparation of inulin products. Foreign patent documents. United States. **5968365**.
- Leite-Toneli, J. T. C.; Murr, F. E. X.; Martinelli, P.; Dal Fabbro, I. M. and Park, K. J. (2007). "Optimization of a physical concentration process for inulin." J. of Food Eng. **80** 832-838.
- Li, W.; Li, J.; Chen, T. and Chen, C. (2004). "Study on nanofiltration for purifying fructo-oligosaccharides: I. Operation modes." J. Membr. Sci. **245**(1-2): 123-129.
- Li, W. L., J.; Chen, T.; Chen, C.; Zhao, Z. (2005). "Study on nanofiltration for purifying fructo-oligosaccharides: II. Extended pore model." J. Membr. Sci. **258**(1-2): 8-15.
- Lin, S. C. and Lee, W. C. (1998). "Separation of a fructo-oligosaccharide mixture by hydrophilic interaction chromatography using silica-based micropellicular sorbents. ." J. Chromatogr. A **803**: 302-306.
- Lipnizki, F.; Boelsmand, J. and Madsen, R. F. (2002). "Concepts of industrial-scale diafiltration systems." Desalination **144**(1-3): 179-184.
- Loehmar, K. (1996). Soluble instant inulin and process for its manufacture European Patent Societe des produits NESTLE S.A. **EP0824109**
- Lomax, J. A.; Gordon, A. H. and Chesson, A. (1985). "A Multiple-Column Approach to the Methylation Analysis of Plant Cell Walls. ." Carbohydr. Res. **138**: 177-188.
- Lopez, M. G.; Mancilla-Margalli, N. A. and Mendoza-Diaz, G. (2003). "Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul." J. Agric. Food Chem. **51**(27): 7835-40.
- Mancilla-Margalli, N. A. and Lopez, M. G. (2002). "Generation of Maillard compounds from inulin during the thermal processing of *Agave tequilana* Weber Var. azul." J. Agric. Food Chem. **50**(4): 806-12.
- Mancilla-Margalli, N. A. and Lopez, M. G. (2006). "Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyliroion* species." J. Agric. Food Chem. **54**(20): 7832-9.
- Marchese, J.; Ponce, M.; Ochoa, N. A.; Pradanos, P.; Palacio, L. and Hernandez, A. (2002). "Fouling behaviour of polyethersulfone UF membranes made with different PVP." J. Membr. Sci. **211**: 1-11.
- Marshall, A. D.; Munro, P. A. and Trägårdh, G. (1993). "The effect of protein fouling in microfiltration and ultrafiltration on permeate flux, protein retention and selectivity : a literature review." Desalination **91**: 65-108.
- Martínez-Torres, R. and Morales-Durán, U. R. (2007). "Estudio de la deshidratación del maguey (*Agave atrovirens* Karw) para la obtención de un producto seco con alto contenido de fructooligisaccharidos." Bebidas Mexicanas **Febrero/Marzo**: 11-19.

- Martinez Del Campo Padilla, M. G. (1999). Determinación cuantificación e hidrólisis de inulina en el aguamiel de Agave pulquero *Agave atrovirens*. Facultad de Química. México, D.F., Universidad Nacional Autónoma de México. Licenciatura en Química de Alimentos: 91.
- Medina-Mora, M. E.; Borges, G. and Villatoro, J. (2000). "The measurement of drinking patterns and consequences in Mexico." J. Subst. Abuse **12**(1-2): 183-96.
- Meixueiro-Valverde, E. (2004). Cell- and gland-restorative and/or anti-carcinogenic liquid agave extract and method of obtaining same. The World Intellectual Property Organization (WIPO) Mexico. WO/2004/084926.
- Mellal, M.; Jaffrin, M. Y.; Ding, L. H.; Delattre, C.; Michaud, P. and Courtois, J. (2008). "Separation of oligoglucuronans of low degrees of polymerization by using a high shear rotating disk filtration module." Sep. Purif. Technol. **60**(1): 22-29.
- Mi, L. and Hwang, S.-T. (1999). "Correlation of concentration polarization and hydrodynamic parameters in hollow fiber modules." J. Memb. Sci. **159**(1-2): 143-165.
- Moerman, F. T.; Van Leeuwen, M. B. and Delcour, J. A. (2004). "Enrichment of higher molecular weight fractions in inulin." J. Agric. Food Chem. **52**(12): 3780-3.
- Mondor, M.; Girard, B. and Moresoli, C. (2000). "Modeling flux behavior for membrane filtration of apple juice." Food Res. Int. **33**(7): 539-548.
- Muramatsu, M.; Nakakuki, T.; Kainuma, S. and Miwa, T. (1994). Process for the preparation of branched fructooligosaccharides. European Patent. EP0307158.
- Mysore, N. R.; Shivakumara, M.; Sangeetha, P. T.; Prapulla, S. G. and Prakash, M. (2005). Process for preparation of fructooligosaccharides (FOS). United States Patent Application. United States. USPTO 20050069627.
- Narro-Robles, J.; Gutierrez-Avila, J. H.; López-Cervantes, M.; Borges, G. and Rosovsky, H. (1992). "La Mortalidad por Cirrosis Hepática en México I. Características Epidemiológicas Relevantes. ." Salud Publica de México **34**(4): 378-387.
- Nataraj, S.; Schomacker, R.; Kraume, M.; Mishra, I. M. and Drews, A. (2008). "Analyses of polysaccharide fouling mechanisms during crossflow membrane filtration." J. Membr. Sci. **308**(1-2): 152-161.
- Nitsch, E. (1996). Process for the production of a pyrogen-free fructan which is readily water-soluble. United States Patent. Linz, Austria, Laevosan Gesellschaft mbH. 5,561,226.
- NMX-V-022. (1972). "Aguamiel (Hydromiel) " Dirección General de Normas Mexicanas <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-V-022-1972.PDF>. Retrieved Marz, 2008.
- NMX-V-037. (1972). "Pulque manejado a granel". Retrieved Marz, 2008 <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-V-022-1972.PDF>.
- Nobel, P. S. and Bobich, E. G. (2002). "Initial net CO<sub>2</sub> uptake responses and root growth for a CAM community placed in a closed environment." Ann. Bot. (Lond) **90**(5): 593-8.
- Nobel, P. S.; Castaneda, M.; North, G.; Pimienta-Barrios, E. and Ruiz, A. (1998). "Temperature influences on leaf CO<sub>2</sub> exchange, cell viability and cultivation range for *Agave tequilana*." J. Arid Environ. **39**(1): 1-9.
- Paseephol, T.; Small, D. and Sherkat, F. (2007). "Process optimisation for fractionating Jerusalem artichoke fructans with ethanol using response surface methodology." Food Chem. **104**(1): 73-80.
- Pilon-Smits, E.; Ebskamp, M.; Paul, M. J.; Jeuken, M.; Weisbeek, P. J. and Smeekens, S. (1995). "Improved Performance of Transgenic Fructan-Accumulating Tobacco under Drought Stress." Plant Physiol. **107**(1): 125-130.
- Pilon-Smits, E. A. H.; Ebskamp, M. J. M.; Weisbeek, P. J. and Smeekens, S. C. M. (1996). Fructan accumulation in transgenic plants: effects on growth, carbohydrate

- partitioning and stress resistance. Rockville, MD, Pontis, H.G.; Salerno, G. L.; Echeverria, E. J.
- Platt, S.; Mauramo, M.; Butylina, S. and Nystrom, M. (2002). "Retention of pegs in cross-flow ultrafiltration through membranes." Desalination **149**(1-3): 417-422.
- Pollock, C. J. and Cairns, A. J. (1991). "Fructan metabolism in grasses and cereals. ." Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **42** 77-101.
- Pontis, H. G. and Del Campillo, E. (1985). Biochemistry of storage carbohydrates ingreen plants. Fructans D. R. Dey PM. London, Acad. Press: 205-227.
- Pool-Zobel, B.; Van Loo, J.; Rowland, I. and Roberfroid, M. B. (2002). "Experimental evidences on the potential of prebiotic fructans to reduce the risk of colon cancer." Br. J. Nutr. **87**(2): S273-81.
- Pool-Zobel, B. L. (2005). "Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data." Br. J. Nutr. **93**(1): S73-90.
- Pool-Zobel, B. L. and Sauer, J. (2007). "Overview of experimental data on reduction of colorectal cancer risk by inulin-type fructans." J. Nutr. **137**(11 Suppl): 2580S-2584S.
- Praznik, W.; Cieslik, E. and Filipiak-Florkiewicz, A. (2002). "Soluble dietary fibres in Jerusalem artichoke powders: composition and application in bread." Nahrung/Food **46**(3): 151-7.
- Puebla, A. F.; Salerno, G. L. and Pontis, H. G. (1997). "Fructan metabolism in two species of Bromus subjected to chilling and water stress." New Phytol. **136**: 123-129.
- Ramírez, J. (1995). "Los Magueyes, plantas de infinitos usos." Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad, México. Biodiversitas (3): 1-7.
- Rendiles, O. E.; Marín, L. M.; Castro, R. C. and Ferrer, M. O. (2004). "Variación en la concentración foliar del guayabo (Psidium guajava L.) y su relación con el rendimiento del cultivo." Rev. Fac. Agronom.-LUZ **21**: 36-50.
- Rios, G. M.; Belleville, M.-P. and Paolucci-Jeanjean, D. (2007). "Membrane engineering in biotechnology: quo vamus?" Trends Biotechnol. **25**(6): 242-246.
- Ritsema, T. and Smeekens, S. (2003a). "Engineering fructan metabolism in plants." J. Plant Physiol. **160**(7): 811-820.
- Ritsema, T. and Smeekens, S. (2003b). "Fructans: beneficial for plants and humans." Curr. Opin. Plant Biol. **6**(3): 223-30.
- Roberfroid, M. (2002a). "Functional food concept and its application to prebiotics." Dig. Liver Dis. **34 Suppl 2**: S105-10.
- Roberfroid, M. B. (2002b). "Functional foods: concepts and application to inulin and oligofructose." Br. J. Nutr. **87**(2): S139-43.
- Roberfroid, M. B. (2005). "Introducing inulin-type fructans." Br. J. Nutr. **93**(1): S13-25.
- Roberfroid, M. B. (2007). "Inulin-type fructans: functional food ingredients." J. Nutr. **137**(11): 2493S-2502S.
- Rodriguez-Huezo, M. E.; Duran-Lugo, R.; Prado-Barragan, L. A.; Cruz-Sosa, F.; Lobato-Calleros, C.; Alvarez-Ramirez, J. and Vernon-Carter, E. J. (2007). "Pre-selection of protective colloids for enhanced viability of Bifidobacterium bifidum following spray-drying and storage, and evaluation of aguamiel as thermoprotective prebiotic." Food Res. Int. **40**: 1299-1306.
- Saha, N. K.; Balakrishnan, M. and Ulbricht, M. (2006). "Polymeric membrane fouling in sugarcane juice ultrafiltration: role of juice polysaccharides." Desalination **189**(1-3): 59-70.
- Saha, N. K.; Balakrishnan, M. and Ulbricht, M. (2007). "Sugarcane juice ultrafiltration: FTIR and SEM analysis of polysaccharide fouling." J. Memb. Sci. **306**(1-2): 287-297.
- Sánchez-Marroquín, A. and Hope, P. H. (1953). "Agave Juice Fermentation and Chemical Composition Studies of Some Species." J. Agric. Food Chem. **1** (3): 246-249.



- Satyanarayana, M. N. (1976). "Biosynthesis of oligosaccharides and fructans in *Agave vera cruz*: I. Properties of a partially purified transfructosylase." Indian J. Biochem. Biophys. **13**: 261-266.
- Schorr-Galindo, S.; Ghommidh, C. and Guiraud, J. P. (2000). "Influence of yeast flocculation on the rate of Jerusalem artichoke extract fermentation." Curr. Microbiol. **41**(2): 89-95.
- Seifert, S. and Watzl, B. (2007). "Inulin and oligofructose: review of experimental data on immune modulation." J. Nutr. **137**(11): 2563S-2567S.
- Serraj, R. and Sinclair, T. R. (2002). "Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? ." Plant Cell Environ. (25): 333-341.
- Shelp, B. J.; Bown, A. W. and Mclean, M. D. (1999). "Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid." Trends Plant Sci. **4**(11): 446-452.
- Sheu, D. C.; Duan, K. J.; Cheng, C. Y.; Bi, J. L. and Chen, J. Y. (2002). "Continuous production of high-content fructo-oligosaccharides by a complex cell system." Biotechnol. Prog. **18**: 1282-1286.
- Silva, R. (1996). "Use of inulin as a natural texture modifier. ." Cereal Foods World. **41**(10): 792.
- Silver, B. and Brinks, H. (2000). Novel inulin fractions, process for preparing same, and food products containing said inulin fractions US. **WO 00/11967**.
- Silver, B. S. (2003). Processes for making novel inulin products. US Patent. USA. **6,569,488**.
- Silver, B. S. (2006). Sucralose sweetening composition United States Patent and Trademark Office. U. Holladay. USA. **7,045,166**: 14.
- Sims, I. M.; Smouter, H.; Pollock, C. J. and Simpson, R. J. (1991). "The separation of complex mixtures of fructo-oligosaccharides from plants." Plant Physiol. Biochem. **29**: 257-267.
- SIVA (2007). "Société Industrielle de la Vallée de l'Ayguès: Crossflow filtration: A new approach to wine clarification." Filtration & Separation **44**(2): 36-39.
- Smits, G.; Daenekindt, L. and Booten, K. (2001). Fractionated polydisperse compositions US Patent. US. **6,303,778**.
- Spiegel, J. E.; Rose, R.; Karabell, P.; Frankos, V. H. and Schmitt, D. F. (1994). "Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients." Food Technol. **48**(1): 85-89.
- Steinkraus, K. H. (1997). "Classification of fermented foods: worldwide review of household fermentation techniques." Food Contr. **8**(5/6): 311-317.
- Steinkraus, K. H. (2002). "Fermentation in world food processing." Comprehens. Rev. Food Sci. Food Saf. **1**: 23-32.
- Susanto, H.; Franzka, S. and Ulbricht, M. (2007). "Dextran fouling of polyethersulfone ultrafiltration membranes--Causes, extent and consequences." J. Membr. Sci. **296**(1-2): 147-155.
- Susanto, H. and Ulbricht, M. (2005). "Influence of ultrafiltration membrane characteristics on adsorptive fouling with dextrans." J. Membr. Sci. **266**(1-2): 132-142.
- Sweet, D. P.; Shapiro, R. H. and P., A. (1975). "Quantitative Analysis by Various Glc Response Factor Theories for Partially Ethylated Alditol Acetates." Carbohydr. Res. **40**: 217-225.
- Takhtajan, A. (1997). Diversity and Classification of Flowering Plants. New York.
- Tárrega, A. and Costell, E. (2006). "Effect of inulin addition on rheological and sensory properties of fat-free starch-based dairy desserts." Int. Dairy J. **16**(9): 1104-1112.
- Tseng, Y. C.; Xiong, Y. L. and Boatright, W. L. (2008). "Effects of inulin/oligofructose on the thermal stability and acid-induced gelation of soy proteins." J. Food Sci. **73**(2): E44-50.
- Tuohy, K. M. (2007). "Inulin-type fructans in healthy aging." J. Nutr. **137**(11): 2590S-2593S.



- Ueno, H. and Shinohara, S. (1995). Production of purified oligosaccharides. J. Patent. Japan. **07031492**
- Urias-Silvas, J. E.; Cani, P. D.; Delmee, E.; Neyrinck, A.; Lopez, M. G. and Delzenne, N. M. (2007). "Physiological effects of dietary fructans extracted from Agave tequilana Gto. and Dasyilirion spp." Br. J. Nutr. **22**: 1-8
- Urias-Silvas, J. E. and Lopez, M. G. (In press). "Prebiotic effect in vitro of Agave fructans." Appl. Environ. Microbiol.
- Valenzuela-Zapata, A. G. (2007). As DO Tequila e Mezcal e a biodiversidade no genero Agave sp. Seminário "Biodiversidade e Denominações de Origem: Uma problemática global", 18 de Abril de 2007, Escola Superior Agrária de Coimbra (ESAC).
- Van De Wiele, T.; Boon, N.; Possemiers, S.; Jacobs, H. and Verstraete, W. (2007). "Inulin-type fructans of longer degree of polymerization exert more pronounced in vitro prebiotic effects." J. Appl. Microbiol. **102**(2): 452-60.
- Van Den Ende, W. and Van Laere, A. (1996). "De-novo synthesis of fructans from sucrose in vitro by a combination of two purified enzymes (sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and fructan: fructan 1-fructosyltransferase) from chicory roots (Cichorium intybus L.)." Plant **200**: 335-342.
- Van Den Mooter, G.; Vervoort, L. and Kinget, R. (2003). "Characterization of methacrylated inulin hydrogels designed for colon targeting: in vitro release of BSA." Pharm. Res. **20**(2): 303-7.
- Van Laere, A. and Van Den Ende, W. (2002). "Inulin metabolism in dicots: chicory as a model system." Plant Cell Environ.(25): 803-813
- Van Loo, J.; Cummings, J.; Delzenne, N.; Englyst, H.; Franck, A.; Hopkins, M.; Kok, N.; Macfarlane, G.; Newton, D.; Quigley, M.; Roberfroid, M.; Van Vliet, T. and Van Den Heuvel, E. (1999). "Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095)." Br. J. Nutr. **81**(2): 121-32.
- Van Reis, R. and Zydney, A. (2007). "Bioprocess membrane technology." J. Membr. Sci. **297**(1-2): 16-50.
- Vazquez, M. I. and Benavente, J. (2003). "A study of temperature effect on chemical, structural and transport parameters determined for two different regenerated cellulose membranes." J. Membr. Sci. **219**(1-2): 59-67.
- Verdonk, J. M.; Shim, S. B.; Van Leeuwen, P. and Verstegen, M. W. (2005). "Application of inulin-type fructans in animal feed and pet food." Br. J. Nutr. **93** (1): S125-38.
- Vernhet, A.; Pellerin, P.; Belleville, M. P.; Planque, J. and Moutounet, M. (1999). "Relative impact of major wine polysaccharides on the performances of an organic microfiltration membrane." Am. J. Enol. Viticult. **50**(1 ): 51-56.
- Vervoort, L.; Vinckier, I.; Moldenaers, P.; Van Den Mooter, G.; Augustijns, P. and Kinget, R. (1999). "Inulin hydrogels as carriers for colonic drug targeting. Rheological characterization of the hydrogel formation and the hydrogel network." J. Pharm. Sci. **88**(2): 209-14.
- Vijn, I. and Smeekens, S. (1999). "Fructan: more than a reserve carbohydrate?" Plant Physiol. **120**(2): 351-60.
- Villard, R.; Robert, F.; Blank, I.; Bernardinelli, G.; Soldo, T. and Hofmann, T. (2003). "Racemic and Enantiopure Synthesis and Physicochemical Characterization of the Novel Taste Enhancer N-(1-Carboxyethyl)-6-(hydroxymethyl)pyridinium-3-ol Inner Salt." J. Agric. Food Chem. **51**(14): 4040 -4045.
- Villegas, B. and Costell, E. (2007). "Flow behaviour of inulin-milk beverages. Influence of inulin average chain length and of milk fat content." Int. Dairy J. **17**(7): 776-781.

- Vladislavljevic, G. T.; Vukosavljevic, P. and Bukvic, B. (2003). "Permeate flux and fouling resistance in ultrafiltration of depectinized apple juice using ceramic membranes." J. Food Eng. **60**(3): 241-247.
- Waleckx, E.; Gschaedler, A.; Colonna-Ceccaldi, B. and Monsan, P. (2008). "Hydrolysis of fructans from Agave tequilana Weber var. azul during the cooking step in a traditional tequila elaboration process." Food Chem. **108**(1): 40-48.
- Wang, I.-F.; Mc Donogh, R. and Morris, A. (2001). Internal hydrophilic membranes from blended anionic copolymers. <http://www.patentstorm.us/patents/6258272-fulltext.html>. U. S. P. 6258272. USA, USF Filtrations and Separations Group, Inc.
- Wang, N. and Nobel, P. S. (1998). "Phloem Transport of Fructans in the Crassulacean Acid Metabolism Species Agave deserti." Plant Physiol. **116**(2): 709-14.
- Wang, X.-L.; Zhang, C. and Ouyang, P. (2002). "The possibility of separating saccharides from a NaCl solution by using nanofiltration in diafiltration mode." J. Membr. Sci. **204**(1-2): 271-281.
- Wang, J. H. Zhang, F.; Teng, D.; Yang, Y. L. (2007). "Ion chromatographic separation and determination of inulin in tuber of Jerusalem artichoke and chicory root with pulsed amperometric detection. ." PTCA (Part B: Chem. Anal.) **43** 558-563.
- Wei, J.-Z. and Chatterton, N. J. (2001). "Fructan biosynthesis and fructosyltransferase evolution: Expression of the 6-SFT (sucrose : fructan 6-fructosyltransferase) gene in crested wheatgrass (Agropyron cristatum)." J. Plant Physiol. **158**(9): 1203-1213.
- Weis, A.; Bird, M. R.; Nystrom, M. and Wright, C. (2005). "The influence of morphology, hydrophobicity and charge upon the long-term performance of ultrafiltration membranes fouled with spent sulphite liquor." Desalination **175**(1): 73-85.
- Wiemken, A.; Sprenger, N. and Boller, T. (1996). Fructan-an extension of sucrose by sucrose. Sucrose Metabolism, Biochemistry, Physiology and Molecular Biology. H. G. S. Pontis, G. L.; Echeverria, E. J. Rockville, MD., Am. Soc. Plant Physiol.: 179-189.
- Yazdanshenas, M.; Tabatabaeenezhad, A. R.; Roostaazad, R. and Khoshfetrat, A. B. (2005). "Full scale analysis of apple juice ultrafiltration and optimization of diafiltration." Sep. Pur. Technol. **47**(1-2): 52-57.
- Yun, J. W. (2003). "Fructooligosaccharides: occurrence, preparation and applications." Enz. Microb. Technol. (Marz 2008).
- Yun, J. W.; Lee, M. G. and Song, S. K. (1994). "Batch production of highcontent fructo-oligosaccharides from sucrose by the mixed-enzyme system of B-fructofuranosidases and glucose oxidase. ." J. Ferment. Bioeng. **77** 159-163.
- Zeman, L. J. and Zydney, A. L. (1996). Microfiltration and ultrafiltration, principles and applications. New York.
- Zularisam, A. W.; Ismail, A. F.; Salim, M. R.; Sakinah, M. and Hiroaki, O. (2007). "Fabrication, fouling and foulant analyses of asymmetric polysulfone (PSF) ultrafiltration membrane fouled with natural organic matter (NOM) source waters." J. Memb. Sci. **299**(1-2): 97-113.
- Zularisam, A. W.; Ismail, A. F. and Salim, R. (2006). "Behaviours of natural organic matter in membrane filtration for surface water treatment -- a review." Desalination **194**(1-3): 211-231.
- Zuniga-Partida, V.; Camacho-Lopez, A. and Martinez-Gomez, A. J. (1997). Method of producing fructose syruo from Agave plants. WIPO. T. C. Company. US. **WO/1997/034017**
- Zwijnenberg, H. J.; Kemperman, A. J. B.; Boerrigter, M. E.; Lotz, M.; Dijksterhuis, J. F.; Poulsen, P. E. and Koops, G.-H. (2002). "Native protein recovery from potato fruit juice by ultrafiltration." Desalination **144**(1-3): 331-334.

# Caractérisation de l'aguamiel et fractionnement des fructanes de jus d'agave par technologie membranaire

## RESUME

Cette étude a été entreprise afin de trouver de nouvelles voies de valorisation des agaves dont la culture est indispensable à l'économie et à l'environnement du Mexique. Elle comprend à la fois un travail de caractérisation de la matière première (aguamiel et extraits de cœurs d'agave) mais également une étude des potentialités des technologies membranaires en vue du fractionnement et de la purification industrielle de fructanes.

Il a été vérifié que l'aguamiel, jus renfermant principalement par des sucres (67% de l'extrait sec) et un peu de fructanes (10% de l'extrait sec) peut être considéré comme une matière première d'intérêt pour l'élaboration de boissons fonctionnelles en raison de la présence, outre les fructanes, d'acides aminés essentiels libres et d'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA).

Les fructanes extraits directement des cœurs d'agave pulquéro et d'*Agave tequilana* sont constitués d'un mélange de structures de type inuline, lévane et graminane branché appelé ici agavine. Le degré de polymérisation maximal ( $DP_{max}$ ) des fructanes, déterminé par chromatographie liquide haute performance d'échange d'anions (CLEAHP) est respectivement égal à 25 pour les fructanes d'agave pulquéro et à 80 pour ceux de l'*Agave tequilana*.

Un procédé de séparation sur membrane impliquant 4 étapes de filtration successives a été mis au point et a permis de préparer à partir d'un mélange de fructanes extrait de cœurs d'*Agave tequilana*, 3 fractions renfermant respectivement des fructanes de haut DP ( $DP > 40$ ), des fructanes de DP intermédiaires ( $10 < DP < 40$ ) et des fructo-oligosaccharides (FOS) dont le DP est inférieur à 10 et ne contenant plus de mono et disaccharides.

**Mots clés;** Jus d'Agave, Aguamiel, fructanes, fructo-oligosaccharides, agavines, ultrafiltration, clarification, fractionnement.

## Characterization of the aguamiel (agave sweet sap) and fractionation of fructans of the agave juice by membrane technology

### ABSTRACT

This study was conducted in order to provide new opportunities to use agaves, their cultivar being essential to the economy and the environmental preservation of Mexico. The study consists both in a general characterization of raw materials (aguamiel and agave heart's extracts) and the assessment of the potential of membrane technology in the fractionation and purification of fructans from this raw material.

This study shows that the aguamiel, a juice composed mainly of sugars (67% of the dry material) and fructans (10% of the dry material) can be of interest for the production of functional drinks, not only for the presence of fructans but also because it contains free essential amino acids and  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA). The fructans extracted directly from agave pulquero and *Agave tequilana* hearts consist of a mixture of structures of the type of inulins, levans and branched graminans known as agavins.

The maximal degree of polymerization ( $DP_{max}$ ) of fructans, determined by anion-exchange high performance liquid chromatography is 80 and 25 for the *Agave tequilana* and pulquero respectively. A mixture of fructans obtained from the heart extracts of *Agave tequilana* has been subjected to a membrane separation process involving four successive filtrations optimized to extract fructans with high ( $>40$ ), intermediate ( $10 < DP < 40$ ) and low ( $<10$ ; fructo-oligosaccharides (FOS)) degrees of polymerization.

**Key words ;** Agave juice, Aguamiel, fructans, fructo-oligosaccharides, agavins, ultrafiltration, clarification, fructan fractionning.